

FRANCISCO EDUARDO MONTEIRO COUSSEAU

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DOS COMPLEXOS  
NITROSILADOS DE RUTÊNIO

Trabalho apresentado como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre, na  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências da Saúde, Departamento  
de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz  
Creczynski Pasa

Florianópolis  
2009



## **Dedicatória**

Dedico esta obra à minha orientadora,  
professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa.

## **Agradecimentos**

Não poderia deixar de louvar a Deus e agradecer por mais esta etapa concluída, sempre na presença das pessoas escolhidas pela força divina que os faz companheiros desta grande jornada que se chama vida, e que também se inicia a cada reencontro, a cada nova idéia e a cada novo desafio. A existência destas pessoas nunca será em vão, quando, em algum momento, somos conduzidos pelas mãos, pelo conforto da palavra amiga e pela esperança, já não mais perdida. Um gesto exemplar em nossas vidas sempre se fará permanente e necessário àqueles homens que desejam a eternidade e perpetuação de seus conhecimentos, de seus valores e de seus princípios.

Obrigado a vocês colegas do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas da UFSC, professores, amigos e familiares.

## **Epígrafe**

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento.”

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo Da Vinci

# ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DOS COMPLEXOS NITROSILADOS DE RUTÊNIO

Francisco Eduardo Monteiro Cousseau

## Resumo

Este estudo demonstrou as propriedades antioxidantes e secundariamente a citotoxicidade de cinco complexos nitrosilados de rutênio: *trans*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(L)(NO)]Cl<sub>3</sub> (A – D; sendo que (A) L = Cafeína, (B) L = Teofileno, (C) L = Metil-1-imidazol, (D) L = Benzoimidazol), e (E) *cis*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(NO)<sub>2</sub>]Cl<sub>3</sub>. Somente o complexo (A) apresentou significativa reatividade identificada pelo método de reatividade antioxidante total (TAR) e também atividade sequestradora de radical ânion superóxido através da redução do nitro *blue* tetrazólio (NBT). Os complexos (A), (B), (C), (D) e (E) exibiram capacidade sequestradora de radicais hidroxilas (\*OH). O potencial decresceu na respectiva ordem: D>A>B>C>E (a maioria dos valores foi menor que 15 µM). O sistema gerador de radicais hidroxilas foi o complexo Fe-ácido nitriloacético (NTA) e a oxidação da deoxirribose. A inibição da mioglobina induzida por radical monóxido de nitrogênio (\*NO) foi observada para os complexos seguindo a ordem: C>B>D>E>A. A proteção da peroxidação lipídica em microssomas (MC) induzida por sistema ascorbato/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> foi potente para os complexos (D) e (E), demonstrando valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 100 µM (de modo dependente da concentração). Adicionalmente, a lipoperoxidação induzida por radical ascorbila em lipossomas de fosfatidilcolina de soja foi inibida por todos os complexos, demonstrando valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 180 µM, no qual apresentou potencial decrescente, seguindo a ordem: D>A>C>B>E. Quando avaliado em microssomas, alguns valores foram similares. Além disto, o complexo (A) protegeu a lipoperoxidação induzida por radiação UV em MC, e somente o complexo (D) protegeu a lipoperoxidação induzida por peroxinitrito. Nenhum dos complexos demonstrou citotoxicidade em hepatócitos, mas os complexos (A) e (C) causaram a morte de células tumorais linfoblásticas de murinos (L1210).

Palavras-chave: antioxidante, nitrosilados, rutênio, citotoxicidade.

# STUDY OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NITROSYL RUTHENIUM COMPLEXES

Francisco Eduardo Monteiro Cousseau

## Abstract

*This study shows the antioxidant and secondary the cytotoxic activity of five different ruthenium nitrosyl complexes: trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(L)(NO)]Cl<sub>3</sub> (A – D; being (A) L = Caffeine, (B) L = Theophylline, (C) L = Methyl-1-imidazole, (D) L = Benzoimidazole), and (E) cis-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(NO)<sub>2</sub>]Cl<sub>3</sub>. Only the complex (A) (L = Caffeine) presented significant reactivity identified by the total antioxidant reactivity (TAR) assay and also potential scavenger activity of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) through the nitro blue tetrazolium (NBT) reduction test. The complexes (A), (B), (C), (D) and (E) showed capability to scavenge hydroxyl radicals (•OH). The respective potential decreased following the order D>A>B>C>E (most of the values of IC<sub>50</sub> were smaller than 15 μM). The system to generate the free radical used was Fe-acetonitrile acid (NTA) and deoxyribose oxidation protection. The inhibition of myoglobin oxidation potential induced by nitrogen monoxide (•NO) was observed for the complexes following the order C>B>D>E>A. The protection of lipid peroxidation in microsomes (MC) induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>/ascorbate system was effective for complexes (D) and (E), with values of IC<sub>50</sub> below 100 μM (concentration-dependent manner). In addition, lipoperoxidation promoted by ascorbyl radical in soybean phosphatidylcholine liposomes was inhibited in all samples presenting values of IC<sub>50</sub> lower than 180 μM, in which presented potential decrease following the order D>A>C>B>E. When evaluated in microsomes, some values of IC<sub>50</sub> were similar. Furthermore, complex (A) protected also the lipoperoxidation induced by UV radiation in MC and only complex (D) protected lipoperoxidation induced by peroxyxynitrite. None of the complexes showed cytotoxicity tested in hepatocytes, but the complexes (A) and (C) caused significant death to a leukemic lymphoblastic cell line (L1210).*

*Key-words: antioxidant, nitrosyl, ruthenium, cytotoxicity.*

## Lista de gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Efeito do complexo (A) como sequestrador do $O_2^{\bullet-}$ .....	87
<b>Gráfico 2.</b> Efeito sequestrante dos complexos nitrosilados de rutênio sob o fluxo de $^{\bullet}OH$ produzidos através da reação de Fenton.....	88
<b>Gráfico 3.</b> Efeitos dos complexos nitrosilados de rutênio no ensaio de TAR.....	90
<b>Gráfico 4.</b> Efeito dos complexos de rutênio na inibição da oxidação de Mb induzida pelo $^{\bullet}NO$ .....	92
<b>Gráfico 5.</b> Efeito dos complexos nitrosilados de rutênio como doadores de $^{\bullet}NO$ .....	93
<b>Gráfico 6.</b> Efeito dos complexos como inibidores da lipoperoxidação induzida pelos $^{\bullet}OH$ (Reação de Fenton) em microssomas e fígado de rato.....	94
<b>Gráfico 7.</b> Efeito protetor dos complexos nitrosilados de rutênio na LPO em lipossomas induzida por $Asc^{\bullet-}$ .....	95
<b>Gráfico 8.</b> Efeito dos diferentes amostras como inibidores da lipoperoxidação induzida pelos $Asc^{\bullet-}$ em microssomas de fígado de rato.....	96
<b>Gráfico 9.</b> Efeito dos diferentes amostras como inibidores da lipoperoxidação induzida por radiação UV em lipossomas de fosfatidilcolina de soja.....	97
<b>Gráfico 10.</b> Efeito protetor dos complexos nitrosilados de rutênio na LPO em microssomas, induzida por radiação UV.....	98
<b>Gráfico 11.</b> Efeito das diferentes amostras como inibidores da lipoperoxidação em microssomas induzida pelo $ONOO^-$ .....	99
<b>Gráfico 12.</b> Curva-padrão para a formação de NT a partir da reação entre 2,0 mM de $ONOO^-$ e a tirosina.....	101
<b>Gráfico 13.</b> Efeito dos complexos como inibidores da nitração do aminoácido tirosina induzida pelo $ONOO^-$ .....	101
<b>Gráfico 14.</b> Ensaio da viabilidade celular, monitorada através do método de MTT.....	103
<b>Gráfico 15.</b> Atividade antitumoral em linhagem de célula L1210, utilizando o método de MTT.....	104



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos complexos (A-E).....	20
<b>Figura 2.</b> Síntese de $\cdot\text{NO}$ .....	28
<b>Figura 3.</b> Estrutura química conformacional dos complexos (A-D) e (E).....	32
<b>Figura 4.</b> Formas de obtenção de energia e reciclagem do $\text{O}_2$ e $\text{CO}_2$ .....	34
<b>Figura 5.</b> Transporte de elétrons, redução do oxigênio molecular e a formação de espécies intermediárias até a total redução à água realizada na mitocôndria.....	38
<b>Figura 6.</b> Representação das reações de produção (equações 2 e 3) e degradação do peróxido de hidrogênio (equações 4 e 5).....	41
<b>Figura 7.</b> Estrutura química dos aminoácidos e do tripeptídeo: GSH.....	42
<b>Figura 8.</b> Processo de ciclo redox na atuação indireta das enzimas como antioxidantes.....	42
<b>Figura 9.</b> Estados químicos da molécula de dioxigênio ( $\text{O}_2$ ).....	46
<b>Figura 10.</b> Equações de formação e decomposição do $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ .....	53
<b>Figura 11</b> Radical tirosina ( $\text{Tir}^\bullet$ ) e a reação de formação da nitrotirosina (NT) e de ditirosina.....	54
<b>Figura 12.</b> Estrutura dos principais aminoácidos reativos ao $\text{ONOO}^-$ .....	55
<b>Figura 13.</b> Reação de oxidação do ascorbato.....	57
<b>Figura 14.</b> Mecanismo hipotético de iniciação da peroxidação lipídica promovida pela presença de ascorbato e ferro microssomal.....	58
<b>Figura 15.</b> Estrutura do fosfoglicerídeos.....	59
<b>Figura 16.</b> Diferentes estruturas dos fosfolipídios e suas cargas predominantes.....	60
<b>Figura 17.</b> Estrutura em bicamada de fosfolipídios.....	61
<b>Figura 18.</b> Processo de LPO. Em que, 1: abstração do hidrogênio; 2: reação com oxigênio molecular e formação de radical peroxila; 3: formação de uma espécie radicalar centrada no carbono; e 4: formação de endoperóxido e produtos: MDA: malonildialdeído e 4-HDA: 4-hidróxi-alcenais.....	63
<b>Figura 19.</b> Estrutura do ácido graxo poliinsaturado (AGPI).....	64
<b>Figura 20.</b> Reação de condensação do MDA e <i>TBA</i> .....	66
<b>Figura 21.</b> Característica estrutural dos lipossomas, exemplo de vesícula grande multilamelar ( <i>MLVs</i> ).....	67
<b>Figura 22.</b> Imagem esquerda: sistema de extrusão utilizado para a produção de <i>LUVs</i> a partir das <i>MLVs</i> . Imagem direita: estrutura da vesícula grande unilamelar ( <i>LUV</i> ).....	68
<b>Figura 23.</b> Método de hidratação para obtenção de lipossomas do tipo <i>MLVs</i> ....	68
<b>Figura 24.</b> A densidade ótica (DO) de 434 nm quantifica o íon ferroso do grupamento heme e 405 nm: quantifica o íon férrico do grupamento heme.....	78
<b>Figura 25.</b> Síntese de peroxinitrito: método de <i>Quenched-Flow</i> .....	82

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Estrutura química dos ligantes (L).....	21
<b>Tabela 2.</b> Complexidade biológica do radical monóxido de nitrogênio.....	29
<b>Tabela 3.</b> Peso molecular dos complexos (A-E).....	32
<b>Tabela 4.</b> Nomenclatura química dos complexos (A-E).....	33
<b>Tabela 5.</b> Resumo das principais defesas antioxidantes em sistemas biológicos.....	44
<b>Tabela 6.</b> Principais óxidos de nitrogênio.....	51
<b>Tabela 7.</b> Tempo de meia vida das principais ERs.....	52
<b>Tabela 8.</b> Velocidade das reações.....	53
<b>Tabela 9.</b> Classificação dos principais tipos de lipossomas.....	67
<b>Tabela 10.</b> Potencial de redução e valores de IC <sub>50</sub> .....	89
<b>Tabela 11.</b> Resumo das principais atividades antioxidantes.....	105

## Lista de equações

<b>Equação 1.</b> Liberação do ligante nitrosilo.....	18
<b>Equação 2.</b> Dismutação catalisada enzimaticamente pela SOD.....	41
<b>Equação 3.</b> Dismutação espontânea.....	41
<b>Equação 4.</b> Atividade enzimática da catalase.....	41
<b>Equação 5.</b> Atividade enzimática da peroxidase.....	41
<b>Equação 6.</b> Produção de radicais hidroxilas.....	48
<b>Equação 7.</b> Formação de peroxinitrito.....	48
<b>Equação 8.</b> Decomposição do ácido hipocloroso.....	48
<b>Equação 9.</b> Processo de auto-oxidação do $\text{Fe}^{2+}$ .....	49
<b>Equação 10.</b> Formação de peróxido de hidrogênio.....	49
<b>Equação 11.</b> Reação de Fenton.....	49
<b>Equação 12.</b> Reação de Weiss.....	49
<b>Equação 13.</b> Reação de Haber-Weiss.....	49
<b>Equação 14.</b> Oxidação da hemoglobina.....	56
<b>Equação 15.</b> Formação de radicais lipídicos alcóxila e hidroxila, a partir da degradação dos hidroperóxidos catalisada por $\text{Fe}^{2+}$ .....	64
<b>Equação 16.</b> Formação de radicais lipídicos peróxila e hidroxila, a partir da degradação dos hidroperóxidos catalisada por $\text{Fe}^{3+}$ .....	64

## Abreviaturas

A/O água/óleo  
 ABAP 2,2-azo *bis*(2-amidinopropano)  
 ADP adenosina difosfato  
 AGPI ácido graxo poliinsaturado  
 Asc<sup>•-</sup> radical ascorbila  
 ATP adenosina trifosfato  
 CAT catalase  
 COX-2 cicloxigenase-2  
<sup>•</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> radical ânion carboxilato  
 DHA ácido dehidroascórbico  
 DNA ácido desoxirribonucléico  
 EAT tumor ascítico de Erlich  
 eNOS óxido nítrico sintase endotelial  
 ER espécie reativa  
 ERN espécie reativa de nitrogênio  
 ERO espécie reativa de oxigênio  
 GMP monofosfato de guanidina  
 GST glutathione transferase  
 GTP guanilato trifosfato  
 IC<sub>50</sub> concentração inibitória de 50%  
 iNOS óxido nítrico sintase induzida  
 LDLs lipoproteínas de baixa densidade  
 LEC líquido extracelular  
 LPO lipoperoxidação  
 LUV vesícula grande unilamelar  
 Mb mioglobina  
 MC microssoma  
 MDA malondialdeído  
 metaMb metamioglobina  
 MLV vesícula multilamelar  
 MPO mieloperoxidase  
 MTT sal de tetrazólio ou brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
 NADP nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada  
 NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida  
 NaNPS nitroprussiato de sódio  
 NBT sal de tetrazólio ou nitro blue tetrazólio  
 nNOS óxido nítrico sintase neuronal  
<sup>•</sup>NO radical monóxido de nitrogênio  
<sup>•</sup>NO<sub>2</sub> radical dióxido de nitrogênio  
 NOS óxido nítrico sintase  
 NTA ácido nitriloacético  
 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical ânion superóxido  
<sup>•</sup>OH radical hidroxila  
 PC fosfatidilcolina  
 PE fosfatidiletanolamina  
 PHGPx glutathione peroxidase de hidroperóxido lipídico

PI fosfatidilinositol  
*pKa* constante de equilíbrio  
*PUFAs polyunsaturated fatty acid*  
RL radical livre  
RNA ácido ribonucléico  
RS• radicais tií  
SNAP S-nitroso-N-acetilpenicilamina  
SOD superóxido dismutase  
*SUV* vesícula unilamelar pequena  
*TAR* reatividade antioxidante total  
*TBA* ácido tiobarbitúrico  
*TBARS* espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
Trx tiorredoxinas  
Tir• radical tirosil  
UDP uridina difosfato  
UV ultravioleta  
V79 linhagem de células tumorais de fibroblasto de pulmão de Hamster  
XO xantina oxidase

## Sumário

1.	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	17
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	22
2.1	A química inorgânica: metais e os organismos vivos.....	22
2.2	A Complexação.....	23
2.2.1	Os complexos de Rutênio.....	24
2.3	A molécula: de monóxido de nitrogênio ou de óxido nítrico ou do radical óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ).....	26
2.4	Os Complexos nitrosilados de Rutênio (L – Ru – NO).....	31
2.4.1	Nomenclatura.....	33
2.5	A origem químico-biológica dos radicais livres (RL).....	33
2.5.1	As espécies reativas (ER): radicais livres e espécies oxidantes	34
2.5.1.1	A reatividade.....	35
2.6	As reações de óxido-redução ou Redox.....	36
2.6.1	O ciclo redox.....	37
2.7.	A produção de EROs e ERNs.....	39
2.8	Atividade antioxidante.....	39
2.8.1	Defesas antioxidantes celulares: prevenção, interceptação e reparo.....	40
2.8.1.1	A prevenção.....	40
2.8.1.2	A interceptação.....	40
2.8.1.2.1	Enzimática.....	40
2.8.1.2.2	Não enzimática.....	42
2.8.1.3	O reparo.....	43
2.8.2	Os mecanismos de ação antioxidante.....	43
2.9	As espécies reativas de oxigênio (EROs).....	45
2.9.1	A reatividade do oxigênio molecular.....	45
2.9.1.1	O radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).....	45
2.9.1.2	O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).....	47
2.9.1.3	O radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ).....	47
2.9.1.3.1	A Reação de Fenton.....	48
2.9.1.4	O radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ).....	50
2.9.1.5	As espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	50
2.9.1.5.1	Os óxidos de nitrogênio.....	50
2.9.1.5.2	A oxidação de hemeproteínas.....	55
2.9.1.6	O radical ânion ascorbilo ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ).....	56
2.10	Os lipídios de membrana.....	58
2.10.1	A peroxidação lipídica.....	61
2.10.2	Os modelos de membrana.....	66
2.10.2.1	Os lipossomas.....	66
2.10.2.2	Os microssomas (MC).....	69
2.11	A viabilidade e respiração celular.....	69
2.12	A metaloterapia antitumoral.....	70
2.13	Os complexos sintéticos.....	71
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	72
3.1	Objetivo geral.....	72
3.1.1	Objetivos específicos.....	72

4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	73
4.1	Reagentes.....	73
4.2	Equipamentos.....	73
4.3	Metodologia.....	74
4.3.1	Obtenção dos complexos nitrosilados de rutênio.....	74
4.3.2	Formação e monitoramento de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	74
4.3.3	Formação e monitoramento de radical hidroxila ( $\bullet OH$ ).....	75
4.3.4	Produção e monitoramento do radical peroxila ( $ROO^\bullet$ ).....	76
4.3.5	Produção e monitoramento do radical monóxido de nitrogênio ( $\bullet NO$ ).....	76
4.3.5.1	Preparação e concentração da hemeproteína: mioglobina.....	77
4.3.6	Preparação de microsossomas (MC) de fígado de rato.....	78
4.3.6.1	Determinação da concentração de proteína.....	79
4.3.7	Ensaio de lipoperoxidação e o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( <i>TBARS</i> ).....	80
4.3.7.1	Peroxidação lipídica em microsossomas de fígado de rato induzida pelo radical ascorbila ( $Asc^{\bullet-}$ ).....	80
4.3.7.2	Peroxidação lipídica em microsossomas de fígado de rato induzida pelo radical hidroxila ( $\bullet OH$ ).....	81
4.3.7.3	Peroxidação lipídica em microsossomas induzida por radiação UV (ultravioleta).....	81
4.3.7.4	Síntese de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).....	82
4.3.7.4.1	Peroxidação lipídica em microsossomas de fígado de rato induzida pelo $ONOO^-$ .....	83
4.3.7.5	Preparação de lipossomas (vesículas multilamelares – <i>MLVs</i> )..	83
4.3.7.5.1	Preparação de lipossomas (vesículas grandes unilamelares – <i>LUVs</i> ).....	83
4.3.7.5.2	Peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina de soja induzida por radical ascorbila ( $Asc^{\bullet-}$ ).....	84
4.3.7.5.3	Peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina de soja induzida por radiação UV (ultravioleta).....	84
4.3.8	Nitração da tirosina por espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	85
4.3.9	Avaliação da viabilidade celular.....	85
4.3.10	Atividade antitumoral.....	85
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	87
5.1	Atividade scavenger do $O_2^{\bullet-}$ .....	87
5.2	Atividade scavenger de $\bullet OH$ .....	88
5.3	Atividade scavenger de $ROO^\bullet$ .....	89
5.4	Atividade scavenger de $\bullet NO$ .....	90
5.5	Atividade dos complexos nitrosilados de rutênio na liberação de $\bullet NO$ .....	92
5.6.1	Proteção da lipoperoxidação em microsossomas induzida por $\bullet OH$ .....	94
5.6.2	Proteção da lipoperoxidação em microsossomas e em lipossomas induzida por $Asc^{\bullet-}$ .....	95
5.6.3	Proteção da lipoperoxidação em microsossomas e em lipossomas induzida por radiação UV.....	97
5.6.4	Proteção da lipoperoxidação em microsossomas induzida por	

	peroxinitrito.....	98
5.7	Atividade inibitória da nitração da tirosina.....	100
5.8	Viabilidade celular.....	103
5.9	Atividade antitumoral.....	105
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	107
7	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	110
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	111
9	<b>ANEXOS.....</b>	123
	A. Trabalho apresentado em evento.....	120



## 1 INTRODUÇÃO

Os complexos de rutênio são de grande interesse para os químicos, devido às suas propriedades relacionadas ao ligante, uma vez que, este é capaz de formar com facilidade substâncias coordenadas de geometria simétrica octaédrica acerca do íon metálico. Além disso, estes complexos apresentam baixa toxicidade, garantindo múltiplas aplicações na área biológica (BORGES et al., 1998; ORVIG; ABRAMS, 1999; CLARKE et al., 1999; BEIRITH et al., 1999; CRECZYNSKI-PASA et al., 2001; CLARKE 2002).

A química do óxido nítrico possui relevante importância no ambiente e em processos tecnológicos, tendo sido objeto de pesquisas ao longo de três últimas décadas, principalmente, pela sua ampla participação em processos fisiopatológicos. O completo entendimento do comportamento químico da interação entre o óxido nítrico e os complexos metálicos nitrosilados são de extrema necessidade para o controle da reatividade destas moléculas (MONCADA, 1999; TFOUNI et al., 2003).

O óxido nítrico é um gás instável, inorgânico e lipossolúvel presente em diversos processos fisiológicos, como: na neurotransmissão, no controle da pressão arterial, na inibição da agregação plaquetária e nas respostas imunológicas. A deficiência ou as altas concentrações desta molécula podem ocasionar diversos processos patológicos relacionados a hipertensão vascular, neurodegeneração e processos inflamatórios e imunológicos, tais como a resposta às toxinas bacterianas e o choque séptico (IGNARRO, 1989; KNOWLES; MONCADA, 1994; MONCADA, 1999; HERENCIA et. al., 2001).

Os complexos de rutênio que possuem ligantes amino em sua estrutura são geralmente estáveis e fornecem um modelo favorável para o estudo de diferentes dissociações. A primeira esfera de coordenação dos complexos aminados de rutênio se mantém intacta mesmo após a oxidação do Ru(II) a Ru(III). Em complexos hexacoordenado do tipo  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{L})\text{NO}^+]^{3+}$  a molécula também apresenta as quatro aminas ligantes posicionadas no plano equatorial, sendo inertes em reações de substituição. Contudo, a reatividade do ligante axial, pode ser modulada pela criteriosa escolha do outro ligante na posição *trans*. Em geral, estes complexos apresentam mecanismos de síntese e reatividade conhecidos, além de possuírem alta solubilidade em meio aquoso. Neste ambiente são fortemente ativos, pois,

liberam facilmente o  $\cdot\text{NO}$  através de uma redução química do ligante nitrosilo (equação 1) (CALLAHAN; MEYER, 1977; BORGES et al., 1998; CRECZYNSKI-PASA et al., 2001; CLARKE, 2002; TFOUNI et al., 2003; BERTOLINI, 2004).



As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas através da redução do oxigênio molecular até a obtenção da molécula de água envolvendo sucessivas reações univalentes que se iniciam por gerar o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). A dismutação deste radical origina o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que por sua vez, formará o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ). Além destas espécies reativas citadas, existem também outras espécies reativas provenientes do nitrogênio (ERNs), entre as quais as mais conhecidas são o óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio ( $\cdot\text{NO}$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), formado a partir da reação do  $\cdot\text{NO}$  com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (KOPPENOL, 1998a; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; RADI, 2000). Além do peroxinitrito, substâncias derivadas do  $\cdot\text{NO}$ , como o nitrito, podem reagir com o ácido hipocloroso, formado no processo inflamatório através da reação da enzima mieloperoxidase com o peróxido de hidrogênio, formando  $\text{NO}_2\text{Cl}$  e  $\cdot\text{NO}_2$ . Estes produtos podem causar diversas consequências para o organismo, como a nitração de aminoácidos, além das reações de oxidação em geral (EISERICH et al. 1996; RADI, 2003; SOUZA et al., 2008).

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam as condições oxidativas e as defesas antioxidantes celulares provoca o estresse oxidativo. Os danos causados por essas espécies reativas são dependentes da quantidade ou da natureza dos mesmos, bem como do local onde são ocasionados e das defesas antioxidantes celulares (SIES, 1993; SIES, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação lipídica é um processo altamente destrutivo relacionado a eventos deletérios como processos inflamatórios crônicos, aterosclerose, carcinogênese, choque séptico, injúria pelo processo de isquemia e reperfusão além do processo de envelhecimento (ARUOMA et al. 1989; DE BONT; LAREBEKE, 2004; WISEMAN; HALLIWELL, 1996; CASTELLI et al., 1997; STANBRO 2000a; STANBRO, 2000b; STANBRO, 2000c). Vários modelos foram desenvolvidos para estimular os efeitos das EROs em estruturas biológicas e quantificar os danos

induzidos pelas mesmas, e avaliar a eficiência de substâncias antioxidantes. Como modelo *in vitro*, o uso de lipossomas é bastante difundido para estudos da estrutura e propriedades da membrana celular, pois sua estrutura em bicamadas e seus constituintes fosfolipídicos podem alcançar grande similaridade com a matriz lipídica das membranas citoplasmáticas e de organelas celulares (SAMUNI et al., 2000; BARCLAY et al., 1997; CASTELLI et al., 1997).

Como modelo *ex-vivo*, os microssomas de fígado de rato costumam ser empregados como fonte de lipídios devido à sua alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, a atividade enzimática oxidante de seu retículo endoplasmático para com substâncias xenobióticas é considerada útil para estudos toxicológicos (VLIETINCK, 2001; KEHRER, 1993).

Os fosfolipídios são importantes alvos das EROs e ERNs, cujas alterações químicas provocam a perda das propriedades físico-químicas relacionadas à permeabilidade, carga, fluidez, e conseqüentemente, seus sítios de ligações com as proteínas intermembranas, levando à inativação das mesmas e perda na homeostase celular (CASTELLI et al., 1997; CASALINO et al., 1996).

O objetivo central deste estudo é avaliar o potencial antioxidante de 5 diferentes complexos nitrosilados de rutênio: *trans*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L(NO)]Cl<sub>3</sub>, (A) L = Cafeína, (B) L = Teofileno, (C) L = Metil-1-imidazol, (D) L = Benzoimidazol (figura 1), (E) L = *cis*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(NO)<sub>2</sub>]Cl<sub>3</sub> (figura 1), uma vez que substâncias nitrosiladas de rutênio análogas às estruturas destes complexos apresentam importantes propriedades biológicas, como a baixa toxicidade e a capacidade de atuarem como doadores de óxido nítrico, demonstrando uma resposta hipotensiva *in vivo* (CLARKE et al., 1999; CLARKE, 2002; MARCONDES et al., 2002).

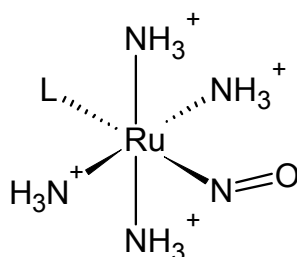
A pesquisa do potencial terapêutico destas substâncias relacionada à via do óxido nítrico tem despertado o interesse da tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de formulações com sistema de liberação prolongada, em emulsões do tipo A/O (BERTOLINI, 2004). Segundo Almeida e Silva et al. (2004), foi relatada a capacidade efetiva *in vitro* destes complexos nitrosilados de rutênio de atuarem como doadores de óxido nítrico, quando incorporados em formulação farmacêutica e submetidos à fotoindução. Holanda et al. (2004) também demonstraram que em pH fisiológico a molécula encontra-se na forma de nitrosilo (NO<sup>+</sup>) coordenado e que, após a adição de ácido ascórbico ao meio de reação, a molécula é reduzida, gerando o <sup>\*</sup>NO (radical monóxido de nitrogênio).

Estudos multidisciplinares revelam a utilização de complexos de rutênio como agente catalítico para diversas reações de hidroxilação (LIU et al., 2007a), e como agente fixador de ultra-estruturas da parede celular fúngica, visualizadas em microscopia eletrônica (TORRES-FERNÁNDEZ; ORDÓÑES, 2003). Ainda, o emprego de complexos de rutênio como ferramenta molecular para reações bioquímicas e biológicas moleculares, ocorrem devido à sua interação com o *DNA*, modulando a clivagem e alterando sua estrutura conformacional (OTERO et al., 2007). Na clínica radioterápica, placas carregadas com rutênio 106 foram efetivas no tratamento de melanoma adquirido após exposição à radiação UVA (TOTAH et al., 2003).

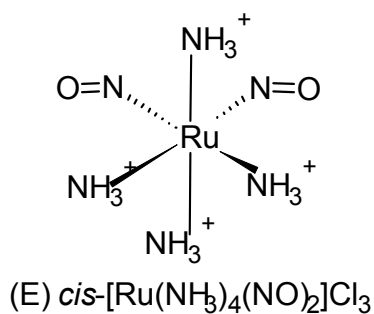
Face às diversas atividades biológicas e químico-reacionais destes complexos nitrosilados de rutênio, iniciou-se uma investigação de suas propriedades antioxidantes, toxicológicas (avaliadas em cortes histológicos de fígado de rato) e citotoxicidade em linhagem de células tumorais (L1210). Historicamente, complexos metálicos apresentam atividade antitumoral, como o caso da *cis*-platina diaminotetracloro (HARTMANN; KEPLER, 1995; BARNARD et al., 1989).

Particularmente, a literatura descreve a utilização dos complexos de rutênio contra diversas linhagens de células tumorais, utilizando métodos *in vitro* e *in vivo* (GUICHARD et al., 2006; LIU et al., 2007b). Alguns resultados demonstram atividade antitumoral frente ao tumor ascítico de Erlich (EAT), de carcinomas de murinos (leucemia linfóide - L1210 e P388), e de sarcoma transplantado mamário humano (MX-1) (VILAPLANA et al., 1998). Também tem sido relatada a redução de metástases em câncer de pulmão (SAVA et al., 1999; SAVA et al., 2002) e a inibição da proliferação de células em câncer de colo retal (GALEANO et al., 1992).

Abaixo estão mostradas as 5 estruturas químicas que serão estudadas (figura 1 e tabela 1).



(A-D) = *trans*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L(NO)]Cl<sub>3</sub>



**Figura 1.** Estrutura química dos complexos (A-D) e (E).

**Tabela 1.** Estrutura química dos ligantes (L). R = complexo de Ru.

Amostra	A	B	C	D	E
Ligante	<i>trans</i> -Cafeína	<i>trans</i> -Teofileno	<i>trans</i> -Metil-1-imidazol	<i>trans</i> -Benzo-imidazol	<i>cis</i> -Nitrosilo
Estrutura do L					
Sinonímia	1,3,7Me <sub>3</sub> Xank <sup>8</sup>	1,3Me <sub>2</sub> Xank <sup>8</sup>	MeImk <sup>2</sup>	BzImk <sup>2</sup>	

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A química inorgânica: metais e os organismos vivos

Muitos elementos metálicos têm função elementar em organismos vivos. Uma característica dos metais é que podem perder elétrons a partir de um estado metálico para formar cátions que tendem a se solubilizar em fluídos biológicos. Estes íons catiônicos são atraídos por moléculas orgânicas ricas em elétrons, especialmente proteínas, lipídios e o ácido desoxirribonucléico (*DNA*). Este princípio é fundamental para a manutenção da vida. Entre os vários exemplos da participação dos metais em sistemas biológicos, cita-se:

- a) a interação do íon ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ) do grupo heme ou ferro-porfirina das hemoproteínas (mioglobina e hemoglobina) com o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ );
- b) a participação do zinco na adequada estrutura do complexo que regula a função dos genes no núcleo celular e também compõe o hormônio chamado insulina, imprescindível para a regulação metabólica de carboidratos;
- c) o cálcio como componente estrutural fundamental dos ossos; e
- d) a incorporação do cobre, zinco, ferro e manganês em proteínas catalíticas denominadas de metaloproteínas, facilitando inúmeras reações químicas necessárias para o adequado metabolismo dos organismos (LEHNINGER, 1986; ORVIG; ABRAMS, 1999; GUTTERIDGE, 1994).

Portanto, a presença da função dos metais em sistemas biológicos torna-se crucial e bastante evidente à medida que o crescente interesse pela utilização destes como matéria prima seja na produção científica acadêmica ou na indústria farmacêutica, pois proporciona algumas vantagens no desenvolvimento de fármacos. Uma vez que assumidas as características metalo-químicas, em especial as relacionadas à coordenação estrutural, aos estados oxidativos, às alterações na afinidade dos ligantes e da cinética de substituição, assim como, uma possível terapia fotodinâmica, integram a capacidade adicional desses complexos na busca por uma molécula com potencial químico medicinal inorgânico (CLARKE et al., 1999; CLARKE, 2002; ALMEIDA E SILVA et al., 2004).

Tradicionalmente, a química medicinal inorgânica tem sido praticada por mais de 5000 anos. O povo egípcio já utilizava o cobre para esterilizar a água cerca de 3000 anos AC, e 1500 anos AC, o ferro e o zinco já eram conhecidos por suas propriedades terapêuticas (ORVIG; ABRAMS, 1999).

A disciplina de química medicinal inorgânica nas instituições de ensino existe há pouco mais de 40 anos, surgindo com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina. O desenvolvimento desta disciplina tem contribuído muito para elucidação do mecanismo de ação, otimização, melhoramento da atividade biológica e a síntese de análogos a partir de moléculas protótipos. O maior exemplo é a platina, com a qual a quimioterapia ainda permanece, mesmo que combinada, para o tratamento de tumores malignos em pacientes com câncer testicular, ovariano e de células pulmonares.

A intencional introdução dos íons metálicos dentro de sistemas biológicos tem objetivo, geralmente, terapêutico ou de diagnóstico (ex.: rutênio vermelho - do inglês:

*red* - corante citológico). Concernente ao radiodiagnóstico, os agentes metálicos são utilizados como corantes biológicos, na ressonância magnética por contraste de imagem, e também como agentes de contraste para raio-X (ORVIG; ABRAMS, 1999; CLARKE, 2002; TOTAH et al., 2003; TORRES-FERNÁNDEZ; ORDÓÑES, 2003; OTERO et al., 2007).

Portanto, o rutênio, elemento químico da tabela periódica de número atômico 44, tem potencial uso no desenho de novos fármacos, fornecendo complexos metálicos ativos, íons metálicos ativos e/ou mesmo ligantes ativos. Estes ligantes podem ser alterados de modo a refinar as propriedades biológicas dos complexos metálicos de rutênio, permitindo o desenvolvimento da disciplina como ciência e de possibilidades terapêuticas (ORVIG; ABRAMS, 1999; CLARKE et al., 1999; CLARKE, 2002; GUICHARD et al. 2006).

## **2.2 A complexação**

Entende-se por reação de complexação, quando o produto formado é um íon complexo solúvel em solução aquosa. Define-se íon complexo como um agregado formado quando um íon metálico liga-se a vários outros íons ou moléculas que se aglomeram ao seu redor. Tais agregados ou unidades do agente complexante são chamadas de ligantes e podem ser removidos ou substituídos por outros ligantes, em diversos tipos de reações. A formação de um complexo obedece ao comportamento ácido-base de Lewis, em que os ligantes doam o par de elétrons (base) e o íon central (ácido) recebe o par de elétrons. Toda a reação ácido-base de Lewis consiste na formação de uma ligação covalente coordenada (RUSSEL, 1994).

### **2.2.1 Os complexos de Rutênio**

Apesar do benefício dos metais nos organismos vivos, a maioria dos mecanismos de ação ainda permanece oculta, principalmente aqueles relacionados

ao grupo dos metais de transição. Descreve-se que a atividade dos complexos metálicos depende do metal, do ligante ou de ambos.

Diferente da terapia convencional em que se empregam outros metais (platina), os fármacos que apresentam o rutênio como átomo central do complexo são utilizados na clínica devido à baixa toxicidade se comparados aos fármacos que contém cisplatina. Sob este aspecto, é importante salientar que o átomo de rutênio é capaz de mimetizar muitas das características físico-químicas do átomo de ferro. Assim, o organismo adota mecanismos de detoxificação, similares aos relacionados com o excesso do metal ferro, principalmente, através da síntese de proteínas transportadoras e quelantes de íons metálicos, entre elas, a transferrina e a albumina (CLARKE et al., 1999; CLARKE, 2002)

Ainda, a toxicidade do metal pode estar diretamente relacionada ao seu estado de oxidação, uma vez que o átomo de rutênio é capaz de atingir vários estados de oxidação em meio fisiológico ( $\text{Ru}^{++}$ ;  $\text{Ru}^{+++}$ ; e  $\text{Ru}^{++++}$ ). Portanto, um dos mecanismos de ação envolvendo os complexos de rutênio seria a participação em reações de óxido-redução, tal qual o ferro (CLARKE, 2002; BERTOLINI, 2004).

O desenvolvimento da síntese química em relação às diferentes séries de complexos de rutênio, particularmente àquelas com ligantes aminos, também tem sido alvo de intensas pesquisas e apresenta algumas vantagens. As reações de síntese são conhecidas e reprodutíveis, permitindo regular a afinidade do ligante, a transferência de elétrons, a velocidade de substituição, o potencial de redução e o aumento do conhecimento relativo ao potencial biológico (CLARKE, 2002). Isto se torna importante, acerca do ligante nitrosilo, no comportamento bioquímico e nas patologias envolvendo a disfunção da via do óxido nítrico, cuja elevação nas concentrações do gás provoca hipotensão e choque. Desta forma, uma terapia objetivando diminuir as concentrações de  $\cdot\text{NO}$  seria recomendada. Fricker et al. (1997) e Storr et al. (2005) demonstraram a capacidade sequestradora dos complexos de rutênio poliaminocarboxilatos:  $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Edta})\text{L}]$ ,  $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Dtpa})\text{L}]$ ,  $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Hedta})\text{Cl}]$  e  $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Hedta})(\text{H}_2\text{O})]$ , produzindo complexos nitrosilados de rutênio ( $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}$ ) estáveis em relação às substituições e também resistentes às reações de redox. Leperre et al. (1995) também demonstraram a capacidade dos complexos de rutênio *red* e do tipo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]$ , em atuar sobre o processo de isquemia e reperfusão em coração isolado de rato.



De forma contrária, buscando o aumento das concentrações relativas à molécula de  $\text{NO}$ , alguns pesquisadores demonstraram a efetividade de outra série de complexos de rutênio na liberação do ligante nitrosilo. O complexo de rutênio ciclamo-nitrosilado ( $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}\text{Cl(NO}^+\text{)}(\text{ciclamo})]^{2+}$ ) tem a capacidade de ser reduzido à forma  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}\text{Cl(ciclamo)(NO}^0\text{)]}^+$  e, conseqüentemente, liberar a molécula de  $\text{NO}$  em meio aquoso (MARCONDES et al. 2002). Este estudo tem fundamental relevância à medida que as terapias tradicionais, empregando principalmente nitroglicerina e nitroprussiato de sódio, desenvolvem a resistência e a tolerância aos nitratos, além de outros efeitos adversos associados à toxicidade (BUTLER; GLIDEWELL, 1987).

TFOUNI et al. (2003) também demonstraram que amino complexos nitrosilados de rutênio do tipo  $\text{trans-[Ru(NO)(NH}_3\text{)}_4\text{L}]^{3+}$ , em que os ligantes são principalmente moléculas N-heterocíclicas, seriam reduzidos, produzindo o  $\text{trans-[Ru(NH}_3\text{)}_4\text{(H}_2\text{O)L]}^{3+}$  e liberando o radical monóxido de nitrogênio ( $\text{NO}^0$ ) sob estímulo fotoquímico. Este efeito, todavia, segue a influência dos distintos ligantes orgânicos. Da mesma forma, técnicas eletroquímicas, utilizando os métodos de voltametria cíclica (VC) e de voltametria de onda quadrada, o  $\text{cis-[Ru}^{\text{II}}\text{(NH}_3\text{)}_4\text{(NO)}_2]^{3+}$  e  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}\text{(NH}_3\text{)}_4\text{(L)(NO)]}^{3+}$ , em que L representa os ligantes cafeína, teofileno, imidazol, metil-1-imidazol e benzoimidazol, demonstraram a labilidade do  $\text{NO}$ , quando os complexos são submetidos às reduções (LOPES et al., 2001; HOLANDA et al. 2004a; HOLANDA et al. 2004b).

Alguns autores relacionam a capacidade de outra série de complexos de rutênio  $\text{trans-[RuCl}_2\text{(ácido nicotínico e derivados)}_4\text{]}$  de interferir na via metabólica do óxido nítrico, inibindo a atividade enzimática das óxido nítrico sintases (NOS) (BEIRITH et al., 1999; SEIFRIZ et al., 1999; CRECZYNSKI-PASA et al., 2001). Neste sentido, uma possível atividade antinociceptiva relacionada à inibição da produção de  $\text{NO}$ , é sugerida. A mesma série de complexos, citada acima, foi investigada quanto aos efeitos provocados na modulação da memória e ansiedade (VALVASSORI et al., 2006), na atividade antioxidante (PAULA et al., 2005) e na atividade enzimática mitocondrial em diferentes tecidos de ratos Wistar (VICTOR et al., 2007).

Portanto, diferentes tipos de complexos de rutênio têm sido amplamente sintetizados e investigados por diversos grupos de pesquisadores. O estudo pioneiro

dos complexos nitrosilados de rutênio teve origem na década de setenta e foi implementado principalmente por Godwin; Meyer, (1971a); Godwin; Meyer (1971b) e Callahan e Meyer (1977). Esta classe de complexos de rutênio, contendo grupamentos nitrosilos (Ru-NO) coordenados em sua esfera, tem sido alvo de interesse devido:

- a) às propriedades físico-químicas, tais como: a labilidade, a acidez e o comportamento redox;
- b) à atividade biológica inerente ao ligante nitrosilo e a complexa atividade bioquímica do radical monóxido de nitrogênio de modo dependente da concentração; e
- c) às propriedades do átomo central da molécula organometálica: o metal rutênio e o comportamento químico e biológico influenciado por outros ligantes, que não os nitrosilos na estrutura do complexo (FRICKER et al., 1997; BORGES et al., 1998; CLARKE et al., 1999; CRECZYNSKI-PASA, 2001; LOPES et al., 2001; MARCONDES et al. 2002; CLARKE, 2002; TFOUNI et al. 2003; ALMEIDA E SILVA et al., 2004; HOLANDA et al., 2004a; HOLANDA et al. 2004b).

### **2.3 A molécula: de monóxido de nitrogênio ou de óxido nítrico ou do radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )**

Após a descoberta em 1981 das propriedades físico-químicas do óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), esta molécula tornou-se objeto de estudo da comunidade científica, devido à sua onipresença nos seres vivos e também ao seu comportamento químico em ambientes biológicos, responsável por uma complexidade de respostas fisiológicas e patológicas.

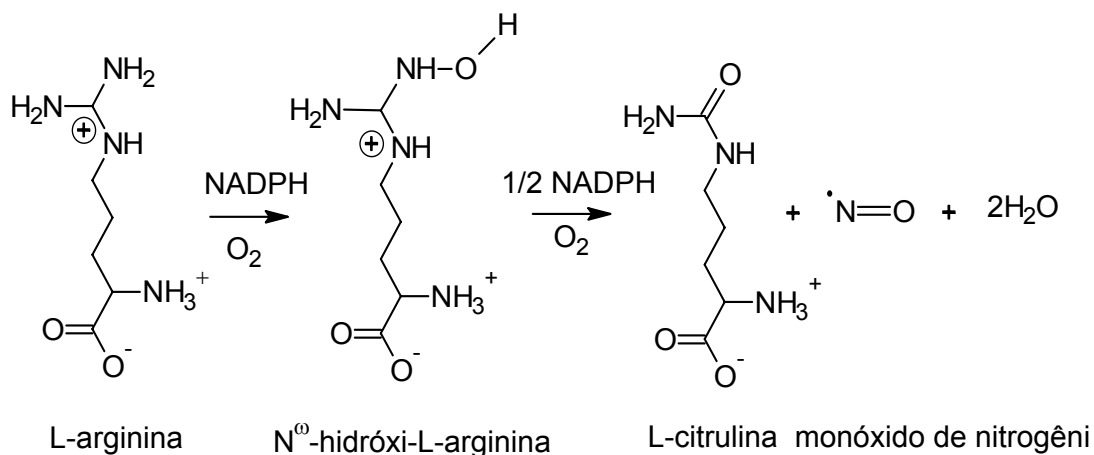
O  $\cdot\text{NO}$ , de natureza inorgânica, foi considerado a menor molécula capaz de atuar como segundo mensageiro em processos biológicos, atuando de forma independente de transportadores específicos e tampouco de canais de passagem intracelulares. Esta molécula difunde-se livremente, seja em ambiente hidrofílico ou lipofílico. Logo, o processo fisiológico que executa torna-se muito mais dependente de suas propriedades físico-químicas do que de seu tamanho estrutural. Em

ambiente aquoso, o coeficiente de difusão do  $\cdot\text{NO}$  é aproximadamente  $2,07 \times 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , podendo difundir por até 26 cm do local de sua origem (IGNARRO, 1989; KNOWLES; MONCADA, 1994; KOPPENOL, 1998a).

Em processos bioquímicos, o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  está diretamente relacionado à homeostase vascular e à modulação neurológica (ou seja: influenciando a comunicação neuronal, a memória e a aprendizagem). Como segundo mensageiro, entre suas atividades fisiológicas, produz o relaxamento da musculatura lisa através da ativação da enzima guanilato ciclase (GC) por mecanismo dependente do sítio ativo heme, catalisando a reação de conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Deste modo, o óxido nítrico tem sido reconhecido como o principal modulador da doença vascular, sendo responsável por eventos relacionados à vasodilatação, à regeneração endotelial, à inibição da adesão plaquetária, da quimiotaxia e da adesão celular endotelial.

Mamíferos sob condições patológicas apresentam elevadas concentrações de óxidos de nitrogênio produzido por macrófagos e demais células do sistema imunológico. Embora, o radical monóxido de nitrogênio não seja um potente agente citotóxico, o seu potencial citotóxico pode ser acentuado. Este potencial deve-se, principalmente, à concentração da molécula e à capacidade em reagir com outras espécies reativas, também produzidas como moléculas de defesa do hospedeiro em processos infecciosos (GREEN et al., 1981; IGNARRO, 1989; WINK; MITCHEL, 1998; MONCADA, 1999; NAPOLI et al., 2006).

A produção endógena de  $\cdot\text{NO}$  (figura 2) é obtida a partir da reação de oxidação do aminoácido L-arginina pelo oxigênio molecular catalisada por isoenzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) e com a participação do co-substrato NADPH (IGNARRO, 1989; NAPOLI et al. 2006).



**Figura 2.** Síntese de  $\cdot\text{NO}$  (Adaptado de KNOWLES; MONCADA, 1994).

As três isoformas da enzima *NOS* são: a neuronal (*nNOS*), a endotelial (*eNOS*) e a indutiva (*iNOS*). As duas primeiras isoformas de *NOS* são constitutivas e tornam-se ativadas de modo dependente da concentração de cálcio intracelular e da proteína transportadora – calmodulina. A terceira isoforma da enzima é produzida por diversas células relacionadas à resposta inflamatória, tornando-se ativada na presença de citocinas e do produto bacteriano chamado de endotoxinas (constituído por lipopolissacarídeos – LPS – componente estrutural da parede celular de bactérias gram-negativas), por um período de tempo de várias horas. A ativação por LPS é muito utilizada em ensaios *in vitro* com a *iNOS*. Altas concentrações de  $\cdot\text{NO}$  implicam em hipotensão e participam de vários processos patológicos, como por exemplo, a artrite, a aterosclerose e o choque séptico. No processo crônico patológico denominado de aterosclerose, ocorre uma disfunção na via do  $\cdot\text{NO}$ , prejudicando a produção de  $\cdot\text{NO}$ , através da diminuição da atividade enzimática da óxido nítrico sintase endotelial (*eNOS*) (NAPOLI et al., 2006).

Entre as propriedades físico-químicas da molécula de  $\cdot\text{NO}$  no estado gasoso cita-se a elevada difusibilidade no ar e em líquidos, o paramagnetismo, e a alta solubilidade em solventes orgânicos comparada ao meio aquoso, semelhante ao oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ). A alta reatividade da molécula de  $\cdot\text{NO}$  promove a reação com grupamentos tiólicos ( $\text{R-SH}$ ), produzindo nitrosotióis ( $\text{R-SNO}$ ); e a coordenação rápida com metais de transição, entre eles o ferro e o cobre (KNOWLES;

MONCADA, 1994; FRICKER et al., 1997; WINK; MITCHEL, 1998; NAPOLI et al. 2006).

**Tabela 2.** Complexidade biológica do radical monóxido de nitrogênio (adaptado de WINK; MITCHEL, 1998).

<b>*NO</b>		
<b>Efeito protetor</b>	<b>Efeito regulatório</b>	<b>Efeito deletério</b>
Antioxidante Inibe adesão leucocitária Inibe a toxicidade do fator de necrose tumoral (FNT)	Tônus vascular Adesão celular Permeabilidade vascular Neurotransmissão Bronquiodilatação Inibe adesão plaquetária Sistema imune Função renal	Inibe a função enzimática Induz o dano ao <i>DNA</i> Lipoperoxidação Aumento da susceptibilidade à radiação, aos agentes de alquilação e aos metais pesados. Depleta as defesas antioxidantes

A descoberta em 1986 de que o fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) estava identificado como a molécula de óxido nítrico fez com que inúmeras atividades biológicas benéficas e deletérias atribuídas ao \*NO fossem identificadas. Para tanto, ficou registrada a complexidade das propriedades biológicas inerentes à tal molécula, exercendo a função de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível, e de agente citotóxico (IGNARRO, 1989).

Apesar de estar relacionada à neurotransmissão, uma elevação nas concentrações neuronais desta molécula, pode causar a senilidade (NAPOLI et al., 2006). Atualmente, a atuação do \*NO como neurotransmissor tem sido alvo de interesse de inúmeros pesquisadores, pois a atividade biológica desta molécula está relacionada com processos de memorização e a possibilidade de tratamento para doenças neurodegenerativas (VALVASSORI et al., 2006). Contudo, estudos sobre o efeito vasodilatador de \*NO são os mais desenvolvidos (BUTLER, GLIDEWELL, 1987; BRUNINI et al., 2006; THOMAS et al., 2008).

A concentração de \*NO mantém-se finamente regulada pelo consumo mitocondrial e também pela ação de substâncias sequestradoras, tal como a oxi-hemoglobina (KOPPENOL, 1998b), uma vez que o \*NO pode oxidar outras moléculas e produzir espécies químicas com alta reatividade, ocasionando modificações em diferentes macromoléculas.

Apesar de ser um radical livre, as reações envolvendo o  $\cdot\text{NO}$  e as moléculas orgânicas, não são favoráveis cineticamente, sendo, necessária uma alta energia de ativação, além de ser um processo lento em moléculas orgânicas cujos orbitais apresentam um par de spins opostos. Todavia, com radicais orgânicos as reações se processam rapidamente (BECKMAN, 1996). Neste contexto, vale lembrar que o  $\cdot\text{NO}$ , apesar de sua natureza radicalar, pode atuar nas etapas de terminação, ou seja, como um bloqueador das reações em cadeia (KOPPENOL, 1998b; WINK; MITCHEL, 1998; THOMAS et al., 2008)

As reações com metais de transição e o  $\cdot\text{NO}$  são favoráveis e rápidas, uma vez que existe doação de densidade eletrônica da molécula para o metal e/ou vice-versa, consistindo um processo chamado de retro-doação. A ligação de  $\cdot\text{NO}$  ao metal pode ocorrer tanto pelo átomo de nitrogênio (forma nitrosilada é a mais comum), assim como pelo átomo de oxigênio (forma isonitrosilada).

As reações mais relevantes em sistemas biológicos ocorrem com as hemoproteínas: guanilato ciclase, citocromo P450 e óxido nítrico sintase (WINK; MITCHEL, 1998; CLARKE et al., 1999; CLARKE, 2002; TFOUNI et al., 2003).

Existem três principais tipos de estado de oxidação para a molécula de monóxido de nitrogênio: o cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ); o radical monóxido de nitrogênio ( $\cdot\text{NO}$ ); e o ânion nitróxido ( $\text{NO}^-$ ). Consequentemente à oxidação do radical monóxido de nitrogênio ( $\cdot\text{NO}$ ) espera-se a formação do cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ), contudo, podem ser produzidas diversas espécies derivadas do metabolismo do nitrogênio, tais como nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), entre outras (IGNARRO 1989; KOPPENOL; 1998a; STANBRO, 2000a; STANBRO, 2000b; STANBRO, 2000c).

Em ambiente fisiológico, e em concentrações nanomolares (nM) de  $\cdot\text{NO}$ , a difusão do mesmo acarreta a diminuição gradativa da sua concentração, permitindo o  $\cdot\text{NO}$  realizar suas funções. Como resultado, é mínima a reação do  $\cdot\text{NO}$  com o oxigênio (velocidade constante de  $k = 10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ), mas, quando ocorre a superprodução de  $\cdot\text{NO}$  em concentrações micromolares ( $\mu\text{M}$ ), a reação com o oxigênio é acelerada exponencialmente, acarretando, a maior formação de ERNs (KOPPENOL, 1998a; KOPPENOL, 1998b).

Uma vez formada, as ERNs promovem a inibição da atividade de inúmeras metaloproteínas (exemplo: hemoglobina), a nitração de proteínas, a peroxidação lipídica, a lesão do *DNA* e o esgotamento das defesas antioxidantes, induzindo à

suscetibilidade dos tecidos à radiação, aos agentes alquilantes e aos metais pesados (BECKMAN, 1996; WINK; MITCHEL, 1998; RADI, 2000; KOPPENOL, 1998a; KOPPENOL, 1998b; SOUZA et al., 2008)

## 2.4 Os complexos nitrosilados de Rutênio (L – Ru – NO)

Apresentados os aspectos relacionados à importância do  $\bullet\text{NO}$  nos processos fisiopatológicos, sendo finamente regulados pelas suas propriedades físico-químicas e que a ausência ou abundância da molécula pode causar desequilíbrios na homeostase, busca-se como uma possível alternativa farmacoterapêutica, substâncias que sejam capazes de liberar ou sequestrar a molécula de  $\bullet\text{NO}$  (BUTLER; GLIDEWELL, 1987; FRICKER et al, 1997; TFOUNI et al. 2003; HOLANDA et al. 2004b).

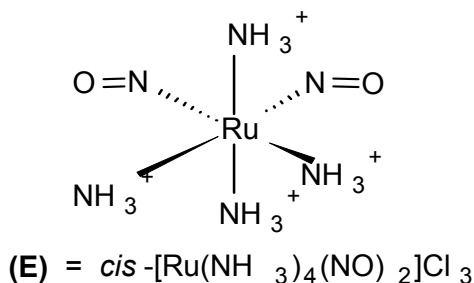
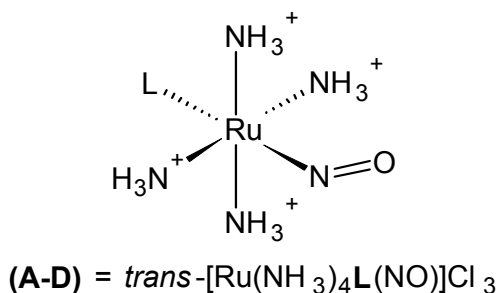
Neste contexto, concentrações relativamente altas de  $\bullet\text{NO}$  podem reagir com o oxigênio molecular ou o radical ânion superóxido presente no ambiente celular, favorecendo a formação de ERNs altamente deletérias às macromoléculas, desregulando suas funções biológicas e produzindo danos celulares e teciduais.

A liberação de  $\bullet\text{NO}$  por fotoindução ou a redução eletroquímica do cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) coordenado ao metal são algumas das propostas terapêuticas já descritas para os complexos nitrosilados de rutênio (LOPES et al., 2001; TFOUNI et al. 2003; SAUAIA, et al., 2005; BORDINI et al., 2005; LUNARDI et al.; 2006; LUNARDI, et al., 2007; HALPENNY et al., 2007). Todavia, a principal característica destas substâncias está suplementada pela capacidade do  $\bullet\text{NO}$  em reagir com metais, gerando complexos estáveis com um intrínseco e amplo potencial biológico.

Uma série de complexos nitrosilados de rutênio do tipo *trans*- $[\text{RuCl}(\text{NO})\text{ciclamo}]^{2+}$  e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{NO})]^{3+}$ , contendo como ligante diversas estruturas como: trietilfosfito, N-imidazol, C-imidazol, cafeína, teofileno, piridina, pirazina, a nicotinamida, benzoimidazol, metil-1-imidazol, entre outros, têm recebido atenção da comunidade científica relativos aos estudos de sequestro de  $\bullet\text{NO}$  e labilidade do ligante nitrosilo. Concomitantemente, os complexos nitrosilados de rutênio contendo um ligante macrocíclico em sua estrutura tem demonstrado

estabilidade e uma potencial atividade biológica *in vivo* e *in vitro* (LOPES et al., 2001; WIERASZKO et al., 2001; MARCONDES et al., 2002; CLARKE, 2002; TFOUNI et al., 2003; HOLANDA et al., 2004b; LOPES et al., 2005).

Assim, as investigações necessárias acerca do planejamento e desenvolvimento de um novo fármaco relacionado à química medicinal inorgânica, fazem-se úteis e imprescindíveis quanto ao seu aspecto estrutural e a potencial atividade biológica. A figura 3 mostra a estrutura química dos complexos nitrosilados de rutênio em suas distintas conformações.



**Figura 3.** Estruturas dos complexos (A-D) e (E).

**Tabela 3.** Peso molecular dos complexos (A-E).

Amostra	Complexo	PM
(A)	<i>trans</i> -[Ru (NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> cafeína (NO)] Cl <sub>3</sub>	498,5
(B)	<i>trans</i> -[Ru (NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> teofileno (NO)] Cl <sub>3</sub>	484,5
(C)	<i>trans</i> -[Ru (NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> metil-1-imidazol (NO)] Cl <sub>3</sub>	386,5
(D)	<i>trans</i> -[Ru (NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> benzoimidazol (NO)] Cl <sub>3</sub>	422,5
(E)	<i>cis</i> -[Ru (NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> nitrosilo (NO)] Cl <sub>3</sub>	335,5



### 2.4.1 Nomenclatura

**Tabela 4.** Nomenclatura química dos complexos (A-E).

(A) <i>cloreto de trans-tetraaminacafeinanitrosilrutênio</i> (II)
(B) <i>cloreto de trans-tetraaminateofilonitrosilrutênio</i> (II)
(C) <i>cloreto de trans-tetraamina(metil-1-imidazol)nitrosilrutênio</i> (II)
(D) <i>cloreto de trans-tetraaminabenzimidazolnitrosilrutênio</i> (II)
(E) <i>cloreto de cis-tetraaminadinitrosilrutênio</i> (II)

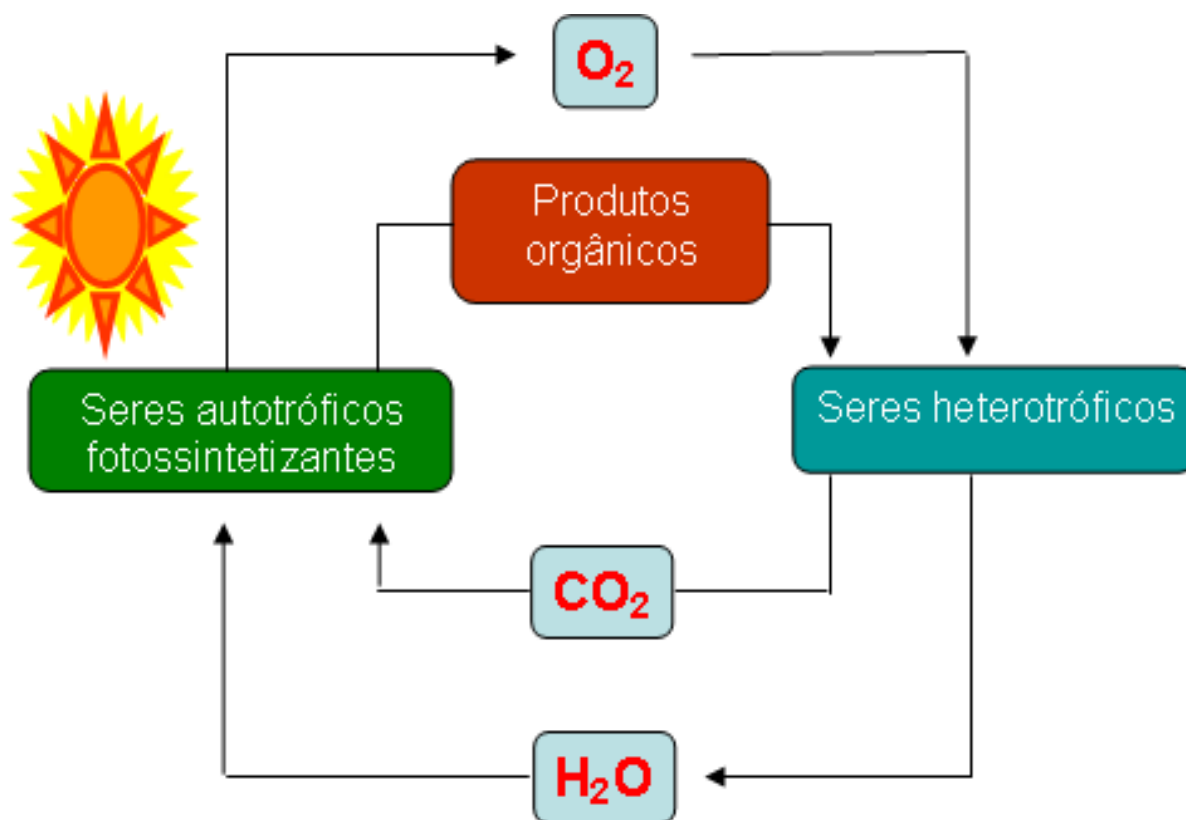
### 2.5 A origem químico-biológica dos radicais livres (RL)

O elemento oxigênio (O) existe no ar como uma molécula conhecida como dióxigênio ou oxigênio molecular (O<sub>2</sub>). Quantidades significantes de oxigênio molecular surgiram na superfície terrestre, há aproximadamente, 2,5 x 10<sup>9</sup> de anos atrás. Evidências geológicas sugerem que o oxigênio seria produto da atividade fotossintética de microorganismos, especialmente algas cianofíceas. A lenta e constante elevação da concentração de O<sub>2</sub> foi acompanhada por um acúmulo na estratosfera de ozônio (O<sub>3</sub>), denominado camada de ozônio. Ambos, dióxigênio e ozônio atuam como um filtro contra a radiação solar, principalmente da luz ultravioleta (UV) (GUTTERIDGE, 1994).

Quando a atmosfera da Terra mudou de um alto estado redutor para um estado rico em oxigênio, como o atual, formas de vida anaeróbicas foram extintas ou retraíram-se a lugares onde o oxigênio fosse ausente. A lenta mudança de forma de vida anaeróbica para aeróbica necessitou da evolução de especializados sistemas antioxidantes, como forma de proteção contra as propriedades tóxicas do oxigênio (GUTTERIDGE, 1994).

A vida aeróbica utiliza o oxigênio para oxidar o carbono e o hidrogênio proveniente da dieta e obter a energia química responsável por manter a temperatura corporal, essencial a vida. Portanto, todas as espécies aeróbicas estão

vulneráveis aos efeitos oxidantes do metabolismo do oxigênio, principalmente devido ao seu alto potencial eletroquímico (GUTTERIDGE, 1994; RIBEIRO et al. 2005).



**Figura 4.** Formas de obtenção de energia e reciclagem do  $O_2$  e  $CO_2$  (adaptado de LEHNINGER, 1986).

### 2.5.1 As espécies reativas (ER): Radicais livres e espécies oxidantes

Define-se o termo radical livre (RL) para átomos ou moléculas que contenham um ou mais elétrons desemparelhados distribuídos no orbital mais externo. Esta definição permite que os metais de transição (elementos que possuem elétrons não pareados) e o hidrogênio sejam qualificados como radicais livres (com exceção do zinco). O fator de maior significado, em relação ao estado reativo destas espécies químicas, são as valências variáveis, o que permite modificações do potencial de oxidação, envolvendo um elétron (HALLIWELL, 1987; GUTTERIDGE, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999)

Além dos radicais livres, algumas espécies reativas são capazes de causar danos às macromoléculas. Essas espécies radicalares ou não, se dividem em grupos químicos de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e também espécies reativas ao nitrogênio (ERNs).

Dentre as EROs incluem-se todos os radicais do oxigênio, como: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ), o radical alquila ( $R^{\bullet}$ ), o alcoxila ( $RO^{\bullet}$ ), o peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) e as espécies reativas: hidroperóxido ( $ROOH$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e o ozônio ( $O_3$ ) (CHANGE et al., 1979; HALLIWELL, 1987; GUTTERIDGE, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VANNUCCHI et al., 1998; HALLIWELL, 1999; LIMA; ABDALLA, 2001).

Dentre as ERNs incluem-se os radicais monóxido de nitrogênio ( $^{\bullet}NO$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $^{\bullet}NO_2$ ), além da espécie reativa peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e os óxidos binários derivados de nitrogênio, como cátion nitrônio ( $NO^+$ ), nitrato, nitrito, trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ), tetraóxido de dinitrogênio ( $N_2O_4$ ), entre outros (WISEMAN, HALLIWELL, 1996; KOPPENOL, 1998a; VAN DER VLIET et al., 1999; RADI, 2000).

O ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) pode induzir reações radicalares no organismo, sendo por isso, considerado como espécie reativa de cloro (ERCI) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; RIBEIRO et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

### 2.5.1.1 A reatividade

A presença de um ou mais elétrons não pareados determina uma atração para um campo magnético e, algumas vezes, torna a substância altamente reativa. Entretanto, ser um RL não implica, obrigatoriamente, em ser uma molécula com alta reatividade. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de uma substância não radical. Sendo assim, os radicais livres, ou provocam ou resultam das reações de óxido-redução (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

## 2.6 As Reações de óxido-redução ou Redox

Além das espécies radicalares, outras moléculas denominadas de espécies reativas podem promover reações de óxido-redução (ou simplesmente redox). Define-se a reação redox, como uma reação em que ocorre a transferência de elétrons (LEHNINGER, 1986; RUSSEL, 1994).

### 2.6.1 O ciclo redox

O balanço redox em líquidos biológicos permite que ocorra freqüentes interconversões entre o estado reduzido e oxidado de uma molécula ou átomo nas organelas, células ou tecidos. A presença de pares redox no sistema motiva o fluxo de elétrons. Alguns sistemas podem ser independentes ou integrados, constituindo o que chamamos de ciclo redox. Entre os pares mais comuns temos os estados de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , GSH e GSSG e a NADPH e  $\text{NADP}^+$ .

Na célula o balanço redox pode ser estimado pela soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox. A capacidade redutora pode ser verificada pela concentração de espécies reduzidas em um par redox. Já o potencial de redução pode ser calculado através de métodos eletroquímicos, em termos matemáticos, pela equação de Nernst (LEHNINGER, 1986; VASCONCELOS et al., 2007).

Alterações no equilíbrio redox em sistemas biológicos desencadeiam uma série de informações celulares, que vão depender da intensidade do estímulo e do tipo de informação. Existe comunicação entre os sistemas de sinalização celular e o estado redox na célula, entretanto, não somente as vias de sinalização estão sujeitos a regulação redox, mas os sistemas de sinalização regulam o estado redox.

Um dos sistemas afetados por tal mudança é o sistema da tioredoxina (classe de enzimas antioxidantes inespecíficas) sensível às mudanças no estado redox da célula, podendo regular a expressão de genes e ativar diversos fatores de transcrição, entre eles o fator nuclear KB (do inglês: NF-KB) e a família AP-1 relacionada aos produtos da oncogenes *c-fos* e *c-jun*. O *c-fos* e o *c-jun* são vias de

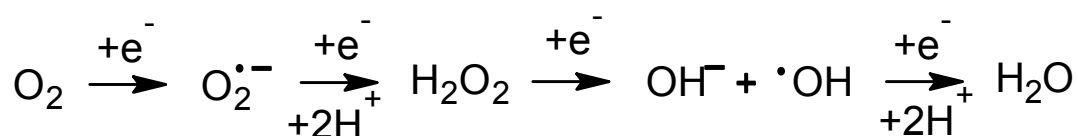
sinalização responsáveis pela proliferação e diferenciação celular (KAMATA; HIRATA, 1999; ADLER et al., 1999; HANCOCK et al., 2001; FORMAN; TORRES, 2002; HADDAD, 2002; RIBEIRO et al., 2005).

As ERs, portanto, executam a função de mensageiros secundários, visto que regulam a expressão de genes sensíveis ao estado redox, promovendo alterações na homeostase celular através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas, geradas como produtos de suas reações. Adicionalmente, as ERs podem ser consideradas moléculas de sinalização porque são produzidas pelas células quando estimuladas; tendo ação autócrina e heterócrina; e quando extintas do meio, possuem a capacidade de reverter à sinalização celular; um exemplo característico deste processo é a interação entre o NF-KB e o IKB (RIBEIRO et al., 2005).

## **2.7 A produção de EROs e ERNs**

A natureza bioquímica de vários oxidantes biológicos tem sido relacionada à manutenção dos organismos vivos e aeróbicos. Estudos demonstram que as células vivas requerem defesas contra estes oxidantes ou pró-oxidantes, pois, sem as tais defesas, em condições aeróbicas não sobreviveriam. Sob esta condição, a evolução das espécies pela perpetuação da vida, buscou desenvolver diferentes tipos de mecanismos antioxidantes como forma de adaptação ao ambiente.

Mesmo em condições basais, organismos aeróbicos produzem espécies reativas, a partir da oxidação de substratos como o carbono e hidrogênio e da redução do oxigênio molecular à água, através do transporte de elétrons realizado na mitocôndria. As etapas intermediárias desta redução produzem duas espécies radiculares de grande interesse bioquímico, sendo o radical ânion superóxido e o radical hidroxila. Além destes, o processo de respiração celular, também produz outras espécies com potencial oxidante, tal qual o peróxido de hidrogênio produzido, seja pela dismutação espontânea do radical ânion superóxido ou pela atividade catalítica enzimática da superóxido dismutase (SOD) (GUTTERIDGE, 1994; BECKMAN, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 5.** Transporte de elétrons, redução do oxigênio molecular e a formação de espécies intermediárias até a total redução à água realizada na mitocôndria (adaptado de GUTTERIDGE, 1994).

Assim, o requerimento para inativação destas moléculas pró-oxidantes é necessariamente vital e contínuo nos organismos aeróbicos. Uma vez que através do metabolismo, muitas espécies reativas podem ser deslocadas ou transportadas dos locais de sua produção. Esta condição é alcançada por algumas espécies, tal qual a atividade de algumas enzimas (NADPH oxidase e as NOS), atacando diversos alvos biológicos em um determinado ambiente, e em outros, serem completamente inócuas (GUTTERIDGE, 1994; BECKMAN, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Cerca de 2% de ERs produzidas em condições metabólicas normais escapam das defesas antioxidantes. Isto sugere que as espécies reativas não são somente produtos das reações relacionadas à demanda energética, mas sim, em reações responsáveis pela homeostase celular, tal qual o processo de detoxificação, através das reações de biotransformação de fase 1 e fase 2; a neuromodulação, a vasculomodulação e a sinalização celular (ADLER et al., 1999; FORMAN; TORRES, 2002; VASCONCELOS et al., 2007).

A produção de RL ocorre em processos inflamatórios através da atividade enzimática da ciclooxygenase-2 (COX-2) e da iNOS e na resposta imunológica aos patógenos, através do processo de fagocitose e a explosão respiratória (do inglês: *burst respiration*) em macrófagos ativados, do qual participam enzimas como NADPH oxidase e da mieloperoxidase (ADLER et al., 1999; FORMAN; TORRES, 2002; VASCONCELOS et al., 2007).

Quando essa produção demasiada de EROs persiste e/ou supera as defesas antioxidantes, provocando danos às muitas biomoléculas do organismo, temos uma condição denominada de estresse oxidativo. As principais biomoléculas atacadas por radicais livres e espécies reativas são o DNA, carboidratos, lipídios e proteínas.

A persistência do estresse oxidativo está diretamente relacionada às diversas

doenças, não sabendo se são a causa ou a consequência das mesmas (aterosclerose, Mal de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral, Síndrome de Down e câncer (SIES, 1993; GUTTERIDGE, 1994; RIBEIRO et al., 2005).

De Bont e Larebeke (2004) explicam que, apesar dos mecanismos de reparo à oxidação do *DNA*, contribui principalmente para o desenvolvimento da mutagênese e da carcinogênese. A exposição do *DNA* às EROs e ERNs provoca a hidrólise do *DNA* entre outras reações. Essas ERs podem ser geradas a partir de substâncias exógenas (xenobióticos), ou então derivadas do metabolismo, através da produção endógena. Outras condições como a incidência de luz ultravioleta (UV), o emprego de ultra-som e microondas, além de uma simples homogeneização também são responsáveis por produzir espécies reativas de oxigênio aos sistemas.

## **2.8 A atividade antioxidante**

Alguns pesquisadores relacionados à área da nutrição sugerem o termo antioxidante para moléculas com propriedades de promover a etapa de terminação da reação em cadeia (em inglês – *stop chain-breaking properties*), principalmente inserida na conservação de alimentos. Esta reação em cadeia pode ser gerada pela decomposição de azo-iniciadores e também pela peroxidação lipídica. Entretanto, uma ampla definição do termo antioxidante seria qualquer substância que, quando presente mesmo em baixa concentração comparada àquelas do substrato oxidado, decresce ou previne a oxidação do substrato. O substrato oxidável inclui todas as moléculas conhecidas *in vivo*. Nesta condição, são relacionados estudos referentes aos alvos biológicos, à extensão dos danos causados; à origem das espécies reativas e radicalares de oxigênio e nitrogênio; e à atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (GUTTERIDGE, 1994; HALLIWELL, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; ROGINSKY; LISSI, 2005).

### **2.8.1 Defesas antioxidantes celulares: prevenção, interceptação e reparo**

De modo geral, as defesas antioxidantes celulares atuam por diferentes mecanismos e em locais distintos na célula. Entre elas, citam-se: (1) a prevenção da formação das EROs; (2) a interceptação das EROs; e (3) o reparo do dano oxidativo em lipídios, proteínas e *DNA* (SIES, 1993; SIES, 1997).

#### **2.8.1.1 A prevenção**

A própria arquitetura e especialização da célula, no caso do enovelamento de enzimas e da cromatina do *DNA* são recursos primários de defesa celular, assim como produção de pigmentos - melanina e carotenóides – que também fornecem proteção contra uma espécie reativa excitada eletronicamente por radiação ultravioleta denominada oxigênio singleto.

A propriedade quelante de algumas moléculas, especialmente proteínas plasmáticas, é o maior fator protetor extracelular para a oxidação de lipídios e à fragmentação do *DNA*. Neste sentido, defesas não-enzimáticas estão disponíveis como algumas proteínas, as quais são capazes de se ligarem aos metais, quelando-os (exemplo: ferritina, transferrina, ceruloplasmina, metalotioneína, entre outras), de modo a manter o ferro e o cobre em suas formas pouco ou não reativas (SIES, 1993; GUTTERIDGE, 1994).

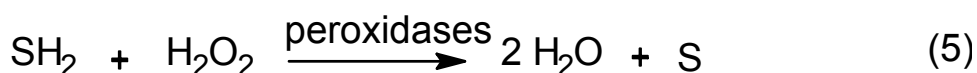
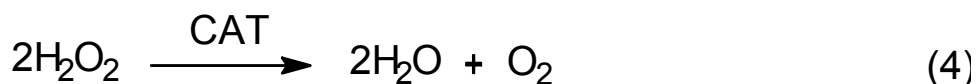
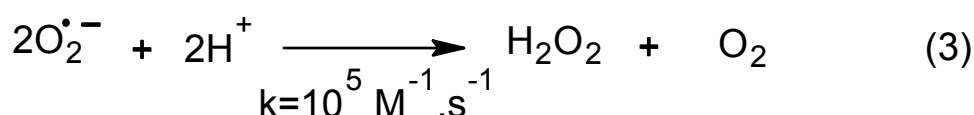
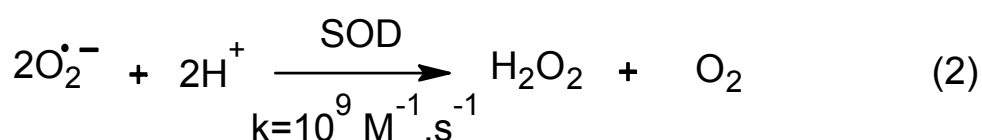
#### **2.8.1.2 A interceptação: enzimática e não enzimática**

##### **2.8.1.2.1 Enzimática**

Todos os organismos eucariontes possuem enzimas antioxidantes. Após a formação de espécies reativas, a primeira interceptação celular contra a atuação das



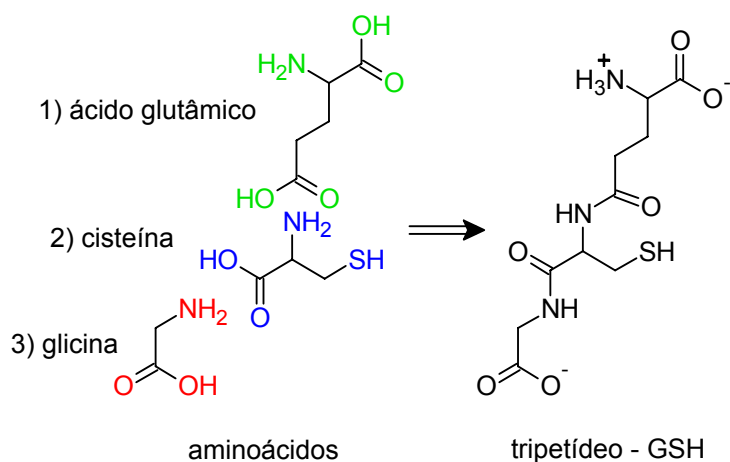
espécies reativas dá-se pela atividade enzimática das enzimas: superóxido dismutase - SOD-Zn (em nível mitocondrial) e SOD-Mn/Fe (em nível citosólico e no líquido extracelular - LEC), catalase (CAT) e glutathione peroxidase-Se (GPx-Se). As reações de defesas endógenas promovidas pelas atividades das enzimas SOD, CAT e peroxidases são demonstradas na figura 6. A dismutação é uma reação na qual duas moléculas idênticas reagem entre si, gerando produtos diferentes (MORRISON; BOYD, 2004). Na equação 2, apresenta-se a dismutação catalisada enzimaticamente pela SOD; e na equação 3, apresenta-se a dismutação espontânea com suas respectivas velocidades.



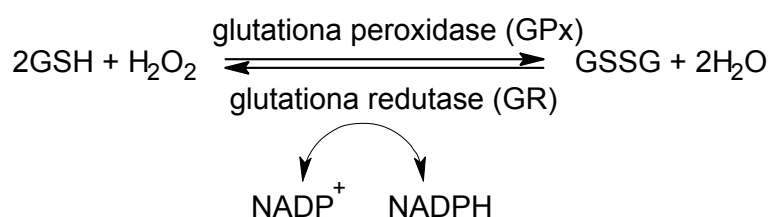
**Figura 6.** Representação das reações de produção (equações 2 e 3) e degradação do peróxido de hidrogênio (equações 4 e 5) (adaptado de SIES, 1993; BECKMAN, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

No entanto, algumas enzimas atuam como antioxidantes indiretos, participando ativamente do ciclo redox celular, uma vez que possuem a função de regenerar o substrato oxidado, de transportar e eliminar as substâncias reativas. Isto se aplica ao processo de reciclagem da glutathione dissulfídica ou oxidada (GSSG) – regenerando o tripeptídeo – a glutathione reduzida (GSH) ou simplesmente glutathione (figura 7), pela atividade enzimática da flavoproteína glutathione redutase (GR) (figura 8). Ainda, em relação aos sistemas antioxidantes indiretos cita-se o sistema transportador conjugado-S-glutathione e a glutathione-S-transferase (GST); e o sistema das tioredoxinas (Trx), enzimas inespecíficas identificadas mais recentemente que

catalisam a redução de muitos substratos, sistema de reparo, entre outros (SIES, 1993; HALLIWELL, 1995; RIBEIRO et al., 2005).



**Figura 7.** Estrutura química dos aminoácidos e do tripeptídeo: GSH.



**Figura 8.** Processo de ciclo redox na atuação indireta das enzimas como antioxidantes.

Recentemente, vem sendo postulado que a hexoquinase mitocondrial pode exercer um controle na geração de espécies reativas na organela em condições fisiológicas (GALINA et al., 2009).

#### 2.8.1.2.2 Não-enzimática

Uma vez formadas as espécies reativas, a estratégia celular é diminuir o dano biológico de modo a produzir espécies com menor reatividade química. Isto ocorre

devido à natureza química do radical livre, possuindo um elétron desemparelhado. Na busca pela estabilização eletrônica de seus orbitais, tende a ganhar elétrons de outra molécula, transformando-se em um não radical, produzindo a partir da outra molécula que reagiu, uma espécie de natureza radicalar, tal qual uma reação em cadeia.

Biologicamente, um eficiente interceptador tem a capacidade de transferir o potencial deletério de uma espécie reativa, considerando o sistema de fases - hidrofílica e lipofílica - para uma espécie de menor capacidade reativa dentro do sistema. Portanto, um exemplo básico desta condição é a substância fenólica ( $\alpha$ -tocoferol), sendo o mais eficiente antioxidante de fase lipofílica (proteção às membranas plasmáticas) e que após reagir com a espécie reativa, forma o radical tocoferila (de menor reatividade), que é regenerado em ambiente hidrofílico (citosol) pelo ácido ascórbico e substâncias contendo grupamentos tióis (SIES, 1993).

É importante salientar que a eficácia dos antioxidantes fenólicos muito presentes em nossa dieta está diretamente relacionada ao tempo de meia-vida da espécie reativa, de forma que ele será mais potente, por exemplo, para o radical peroxila (tempo de meia-vida de 7 segundos) do que para o radical hidroxila (tempo de meia vida de  $10^{-9}$  segundos).

### 2.8.1.3 O reparo

Outra forma de proteção em relação aos danos provocados por espécies reativas, quando as defesas de interceptação não são efetivas, tornando os danos cumulativos é o reparo. O dano à molécula de *DNA* pode acontecer em bases púricas e pirimídicas, modificando-as, e gerando a quebra de um único filamento ou uma dupla quebra dos filamentos. O mecanismo de reparo contém sistemas enzimáticos (proteolítico e lipolítico) capazes de regenerar proteínas (chaperonas) e fosfolipídios de membranas oxidados (ARUOMA et al., 1989; SIES, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

## 2.8.2 Os mecanismos de ação antioxidante

Existem mecanismos principais pelos quais as espécies reativas e radicalares podem ser extintas do meio reacional, ou as consequências destas amenizadas por: remoção do oxigênio molecular ou decréscimo das suas concentrações; remoção de íons catalíticos; seqüestro de radicais livres e espécies reativas; terminação da reação em cadeia; atividade enzimática antioxidante: SOD, catalase, glutathione peroxidase; inibição da atividade enzimática pró-oxidante: óxido nítrico sintase (NOS) xantina oxidase (XO), NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO) são alguns exemplos; extinção ou sequestro do oxigênio singlete; reparo (SIES, 1993; SIES, 1997); e filtração da radiação ultravioleta (LAGUERRE et al., 2007).

**Tabela 5.** Resumo das principais defesas antioxidantes em sistemas biológicos. Onde: GPx: glutathione peroxidase; PHGPx: glutathione peroxidase de hidroperóxido fosfolipídico; UDP: Uridina difosfato (adaptado de SIES, 1993; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1999).

Sistema	Comentários
<b>Não enzimático</b>	
$\alpha$ -tocoferol (vitamina E)	Interrupção da reação em cadeia
$\beta$ -caroteno	<i>Quenching</i> oxigênio singlete
Licopeno	<i>Quenching</i> oxigênio singlete
Ubiquinol-10	Sequestrador
Glutathione (GSH)	Substrato para oxidação - diversos
Ascorbato	Agente redutor
Urato	Sequestrador
Bilirrubina	Antioxidante plasmático
Flavonóides	Agente redutor e quelante de metais
Proteínas plasmáticas (metalotioneínas)	Quelação de metais: transferrina e ceruloplasmina
Substâncias sintéticas	Orgânicas e inorgânicas
<b>Enzimático direto</b>	
Superóxido dismutase (SOD)	SOD-CuZn (citossol e líquido extracelular - LEC), SOD-Mn (mitocôndria)
GSH – peroxidases	GPx (citossol e mitocôndria), PHGPx, ebselen
Catalase	Hemoproteína abundante no peroxissoma
<b>Enzimático indireto (ciclo redox)</b>	
Sistema de conjugação	Glutathione-S-transferase e UDP-glicuronil transferase
NADPH-quinona oxireductase	Redução de dois elétrons
NADPH-GSSG redutase	Manutenção das concentrações de GSH
Sistema de transporte	Eliminação do GSSG tioeter (S-conjugado)
Sistema de reparo	Reparo de DNA, regeneração de proteínas oxidadas (chaperonas) e regeneração de fosfolípidios

Muitas substâncias antioxidantes podem exercer mais de um mecanismo de ação, como o propil-galato, substância que atua como: seqüestrador, interruptor da reação em cadeia e agente quelante de íons metálicos (HALLIWELL, 1995).

## **2.9 As espécies reativas de oxigênio (EROs)**

### **2.9.1 A reatividade do oxigênio molecular**

O oxigênio molecular ou oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ) é uma molécula diatômica, que em seu estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados no orbital anti-ligante  $\pi^*$  de spins paralelos, restringindo a reatividade molecular. Esta natureza limitada ocorre porque, geralmente, as moléculas que doam elétrons ao oxigênio, possuem uma ligação covalente e com os elétrons de spin opostos ocupando o mesmo orbital molecular. A reatividade do oxigênio com biomoléculas é restringida pelo spin. Apesar disto, esta situação pode ser alterada pelo consumo de energia, transformando o oxigênio, não em radical livre, mas, em uma forma excitada, denominada de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ). O oxigênio singleto possui duas formas: a primeira e mais instável, seria a condição em que os dois elétrons de *spins* opostos estão em orbitais diferentes; e a segunda, em que os elétrons de *spins* opostos ocupam o mesmo orbital.

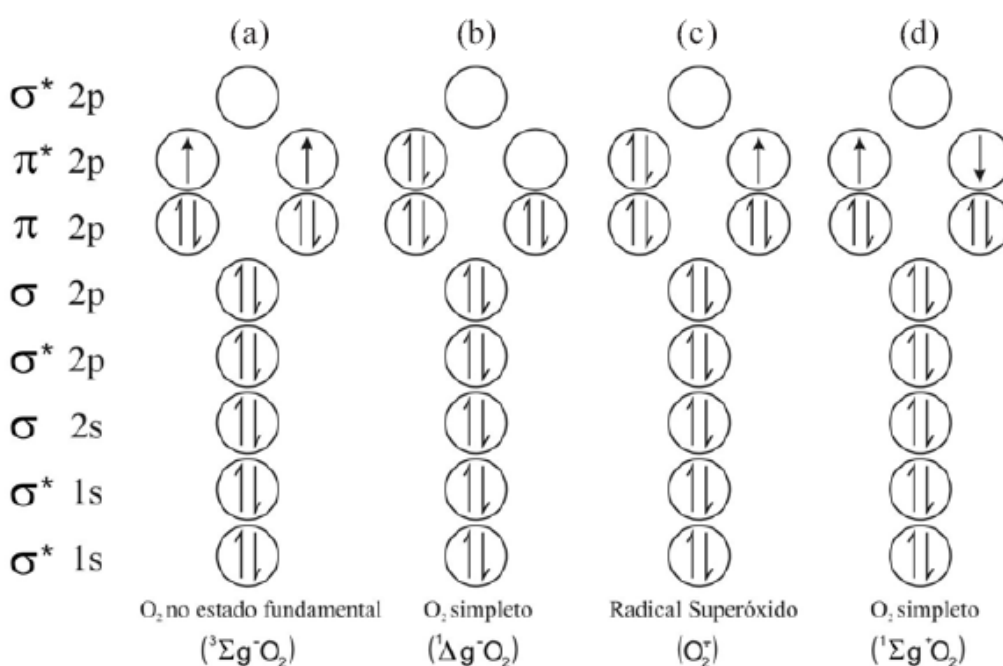
A formação do oxigênio no estado singleto pode ocorrer biologicamente no processo de visão e em cloroplastos, quando o sistema pigmentado absorve fótons, transferindo energia ao  $\text{O}_2$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; RIBEIRO et al., 2005).

#### **2.9.1.1 O radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )**

O oxigênio molecular ao ser reduzido, pela adição de um elétron ao orbital 2p gera como produto o radical ânion superóxido. Em solução aquosa, esta espécie

radicalar é um fraco oxidante e instável, pois desaparece rapidamente devido à dismutação química espontânea ( $k = 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), formando peróxido de hidrogênio e oxigênio como produto. Entretanto, a enzima chamada superóxido dismutase (SOD) descoberta em 1969, por McCord e Fridovich, catalisa fortemente esta reação ( $k = 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (LIOCHEV; FRIDOVICH, 2007).

Ambos,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podem lesar poucos alvos celulares, devido à reatividade limitada, todavia, o radical ânion superóxido reage rapidamente com heme-tiol proteínas, superóxido dismutase (SOD),  $\cdot\text{NO}$  e, em menor intensidade, com o ascorbato. Neste sentido, ensaios *in vitro* tem demonstrado a redução do ferri-citocromo C, sendo bloqueado pela atividade enzimática da SOD. Portanto, a espécie química  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é melhor redutor que oxidante, sendo capaz de reduzir complexos férricos como o citocromo C e Fe-EDTA (COHEN, 1978; KEHRER, 1993; HALLIWELL, 1995).



**Figura 9.** Estados químicos da molécula de dioxigênio ( $\text{O}_2$ ) (adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; RIBEIRO et al. 2005).

A produção de radical ânion superóxido também pode ser mediada através da atividade enzimática da NADPH oxidase, ligada às membranas plasmáticas (SIES,

1993; GUTTERIDGE, 1994) assim como, a partir da degradação de ATP e de GTP, ambos relacionados ao metabolismo de bases púricas e pirimidínicas – em que a enzima xantina oxidase atua sobre o substrato, oxidando a xantina e/ou a hipoxantina e produzindo o ácido úrico. O ciclo redox da xantina oxidase, também produz o  $O_2^{\bullet-}$  (BRAUGHLER et al., 1986).

#### **2.9.1.2 O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )**

Alguns sistemas produtores do radical ânion superóxido também produzem, através da dismutação, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Muitas enzimas são capazes de produzir peróxido de hidrogênio pela transferência de dois elétrons para o oxigênio, entre elas: urato oxidase, glicose oxidase, D-amino oxidase, entre outras. A molécula de peróxido de hidrogênio é relativamente estável na ausência de metais de transição, sendo um fraco agente oxidante e fraco agente redutor. Altamente solúvel em água, difunde-se rapidamente atravessando as membranas celulares. Alguns trabalhos evidenciam a capacidade do peróxido de hidrogênio em atuar como segundo mensageiro, molécula de sinalização ou “gatilho” (GUTTERIDGE, 1994; SIES, 1993 FINKEL, 1999;).

A propriedade redox do  $H_2O_2$  e a sua capacidade de gerar espécies radicalares na presença de íons metálicos de transição foram acompanhadas pelo desenvolvimento de mecanismos de defesa e proteção celular demonstrado pela ação de diversas enzimas, como catalase, glutathione peroxidase e outras peroxidases (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

#### **2.9.1.3 O radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ )**

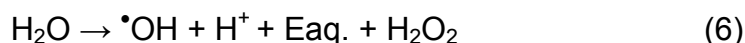
O radical livre hidroxila é o maior produto gerado através da radiólise da água. Ele também pode ser produzido pela homólise do peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição. As reações de Fenton e Haber-Weiss são processos que ocorrem concomitantemente, e são responsáveis pela produção de

radicais hidroxilas, dependente da presença de metais de transição no meio reacional (equações 9-13). Esta espécie radicalar é a mais deletéria de todas as EROs, sendo capaz de oxidar inúmeros alvos biológicos. Além disto, os organismos vivos não possuem enzimas antioxidantes específicas capazes de extinguir este radical devido a sua alta reatividade. Ensaio *in vitro* confirmam a capacidade do radical em provocar danos ao *DNA* isolado, às proteínas e aos lipídios.

O ataque randômico do radical hidroxila pode ocorrer sobre componentes celulares críticos ou não, lesando as moléculas biológicas *in vivo* com uma velocidade constante maior que  $10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (velocidade próxima ao limite da velocidade de difusão). Por esta condição, ele reage com a maioria das moléculas orgânicas praticamente no local onde é produzida. Estudos demonstram que a distância de difusão percorrida na célula pelo  $\cdot\text{OH}$  é somente 3 nm (SIES, 1993; HALLIWELL, 1995; BECKMAN, 1996).

Portanto, existem 4 tipos de mecanismos *in vivo* para produção de radical hidroxila. São eles:

1. Proveniente da exposição à radiação:

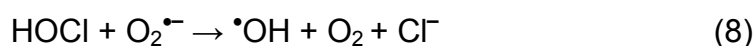


2. Através da reação catalisada por metais de transição, em especial: o ferro e o cobre (Reação de Fenton).
3. Através da reação entre o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e o  $\cdot\text{NO}$ , produzindo  $\text{ONOO}^-$ :



O peroxinitrito é uma molécula citotóxica e também pode decompor-se em pH fisiológico, produzindo vários tipos de espécies reativas nocivas, entre elas, o cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ), o radical dióxido de nitrogênio ( $\cdot\text{NO}_2$ ) e o  $\cdot\text{OH}$ .

4. Através da reação entre o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com velocidade constante, de aproximadamente,  $10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (GUTTERIDGE, 1994; HALLIWELL, 1995):





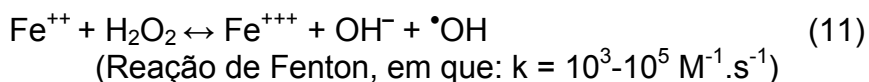
### 2.9.1.3.1 A Reação de Fenton

Em meados de 1876, o químico H. J. H. Fenton descreveu que a reação entre sais de ferro e peróxido de hidrogênio, era capaz de modificar algumas moléculas orgânicas, entre elas, o ácido tartárico.

Considerando a atuação do ferro como agente catalisador, lembramos que o organismo humano contém aproximadamente quatro gramas de ferro fixados em proteínas transportadoras de elétrons (proteínas ferro-enxofre e citocromos), proteínas transportadoras (transferrina), hemoglobinas e mioglobinas (KOPPENOL, 1998b). Na Reação de Fenton o íon ferroso sofre oxidação pelo peróxido de hidrogênio, quebrando (processo químico chamado de fissão homolítica) a ligação O–O do peróxido de hidrogênio e produzindo a liberação de ânions hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) e radicais hidroxilas ( $\cdot\text{OH}$ ). Descrevem-se as reações de Fenton, Weiss e Haber-Weiss e a produção do radical hidroxila, nas equações a seguir (9-12):



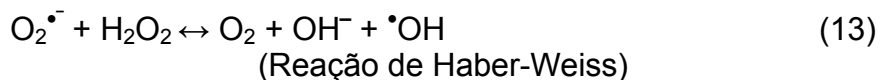
(Processo de auto-oxidação, em que:  $k = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )



(Reação de Fenton, em que:  $k = 10^3\text{-}10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )



(Reação de Weiss, em que:  $k = 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )



(Reação de Haber-Weiss)

O processo demonstra interdependência nas reações do processo oxidativo catalisado pelos íons metálicos e a importância da interconversão dos estados oxidativos dos metais de transição. Ou seja, a reação de Haber-Weiss é cíclica, pois depende da reação de Fenton, que por sua vez, também depende da reação de Weiss (BRAUGHLER et al., 1986; BECKMAN, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIOCHEV; FRIDOVICH, 2007). É importante relatar que a velocidade da reação de Fenton se processa lentamente em solução aquosa, contudo, pode ser

grandemente afetada, conforme o tipo de quelante. Este fato provocou uma dicotomia no conceito sobre a quelação dos metais e a interrupção da produção radicalar. Indiscutivelmente, serviu de fundamento para os estudos relacionados aos mecanismos de quelação e de aplicação na química farmacêutica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

#### **2.9.1.4. O radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ )**

Radicais de oxigênio podem combinar com outros átomos ou macromoléculas e produzir o radical alquila ( $\text{R}^\bullet$ ) ou o alcóxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) e também o radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), ou ainda, radicais endoperóxidos. A formação de  $\text{ROO}^\bullet$  é uma etapa determinante da lipoperoxidação e também produz dano ao *DNA* e às proteínas.

Os radicais peroxilas são espécies típicas de reações em cadeia, envolvendo a peroxidação lipídica, as iniciadas por azo-decomposição (relativo ao ensaio de reatividade antioxidante total - do inglês: *TAR*) e quando reagem com proteínas e seus grupamentos tióis, gerando radicais tiílas ( $\text{RS}^\bullet$ ) que, por sua vez, combinam com o oxigênio molecular presente no ambiente. Radicais peroxilas são relativamente estáveis, pois, seu tempo de meia-vida é cerca de alguns segundos. Tal característica, ao contrário do radical hidroxila, pode fazer com que esta espécie radical se difunda do local de sua origem e exerça a função oxidante em outros alvos biológicos (SIES, 1993; HALLIWELL, 1995).

#### **2.9.1.5. As espécies reativas de nitrogênio (ERNs)**

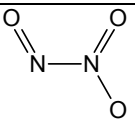
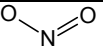
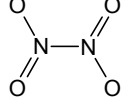
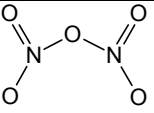
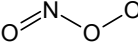
##### **2.9.1.5.1. Os óxidos de nitrogênio**

Umas das características mais interessantes do nitrogênio é a ampla variedade de produtos de sua oxidação, sendo o único entre os elementos a formar

diversos óxidos binários, entre eles, o monóxido de nitrogênio, o óxido de dinitrogênio, o trióxido de dinitrogênio, o dióxido de nitrogênio, o tetraóxido de dinitrogênio e o pentóxido de dinitrogênio (KOTZ; TREICHEL, 1998). Óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) contêm um elétron desemparelhado no seu orbital molecular e, portanto, são considerados radicais livres.

Para tanto, a produção endógena de óxido nítrico é dependente da via do óxido nítrico, sistema complexo, em que a atividade enzimática das isoformas de óxido nítrico sintase é finamente regulada. Em relação à produção do radical dióxido de nitrogênio, além de ser uma espécie intermediária formada a partir da auto-oxidação lenta do  $\text{NO}$ , pode ser detectado na fumaça de cigarros e de veículos automotores. Tem a capacidade de promover a lipoperoxidação e alterações em proteínas. Portanto, o radical dióxido de nitrogênio é um forte oxidante, enquanto o radical monóxido de nitrogênio é um fraco agente redutor (VAN DER VLIET et al., 1995).

**Tabela 6.** Principais óxidos de nitrogênio (adaptado de KOTZ; TREICHEL, 1998; VAN DER VLIET et al. 1999).

Fórmula	Nomenclatura	Estrutura	Estado de oxidação do nitrogênio	Paramagnetis-mo
$\text{N}_2\text{O}$	Óxido de dinitrogênio	$\text{O}=\text{N}-\text{N}$	+1	Não
$\text{NO}^-$	Ânion nitróxido		+1	Não
$\text{NO}^\bullet$	Monóxido de nitrogênio	$\text{N}=\text{O}$	+2	Sim
$\text{N}_2\text{O}_3$	Trióxido de dinitrogênio		+3	Não
$\text{NO}^+$	Cátion nitrosônio		+3	Não
$\text{NO}_2^-$	Nitrito		+3	Não
$\text{NO}_2^\bullet$	Dióxido de nitrogênio		+4	Sim
$\text{N}_2\text{O}_4$	Tetraóxido de dinitrogênio		+4	Não
$\text{NO}_2^+$	Cátion nitrônio		+5	Não
$\text{NO}_3^-$	Nitrato		+5	Não
$\text{N}_2\text{O}_5$	Pentóxido de dinitrogênio		+5	Não
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito ou oxoperoxonitrato		+5	Não

O óxido nitroso ou óxido de dinitrogênio ( $N_2O$ ), popularmente conhecido como “gás hilariante”, não possui tal característica paramagnética e não pode ser considerada uma espécie radicalar.

**Tabela 7.** Tempo de meia-vida das principais ERs (adaptado de IGNARRO, 1989; SIES, 1993; GALLEANO et al., 2002).

Fórmula molecular	Nomenclatura	Tempo de meia-vida (segundos)
$O_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido	- (enzimático)
$HOO^{\bullet}$	Radical peróxido ou per-hidroxila	Instável
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio	- (enzimático)
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxila	$10^{-9}$
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxila	7
$RO^{\bullet}$	Radical alcóxila	$10^{-8}$
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico	
$^1O_2$	Oxigênio simpleto	$10^{-5}$
$^{\bullet}NO$	Radical monóxido de nitrogênio	1-10
$HClO$	Ácido hipocloroso	Estável
$ONOO$	Peroxinitrito	0,05 – 1,0
$Q^{\bullet}$	Radical semi-quinona	Dias
$Asc^{\bullet-}$	Radical ânion ascorbila	50

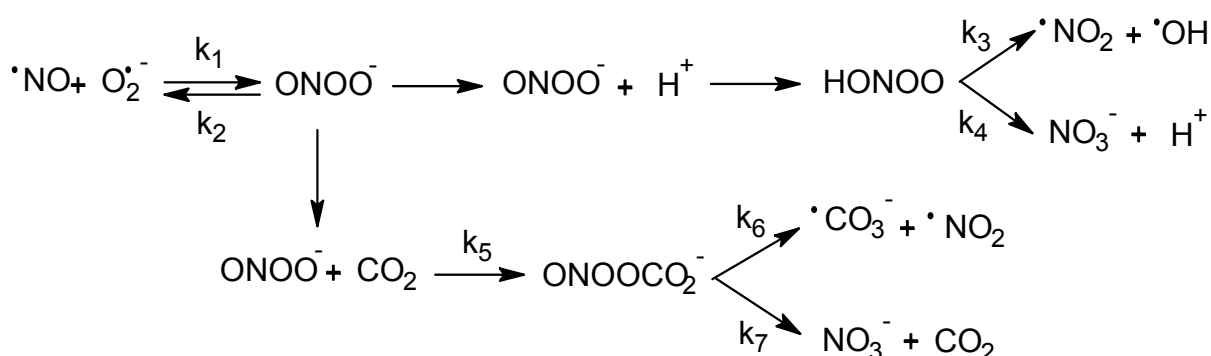
O monóxido de nitrogênio é uma espécie química endógena, em que sua produção é inteiramente dependente da via do  $^{\bullet}NO$ , sistema complexo finamente regulado pela atividade enzimática das isoformas da óxido nítrico sintase. Este radical possui um tempo de meia vida de 1-10 segundos, porém, na presença do radical ânion superóxido seu tempo de meia-vida decresce significativamente.

Na presença de substâncias seqüestradoras do radical ânion superóxido seu tempo de meia-vida volta a aumentar. Este mecanismo foi inicialmente descrito como uma forma de inativar o radical  $^{\bullet}NO$ . Mas, estudos posteriores demonstraram que a reação produzia uma molécula com potente caráter oxidante denominada ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) ou simplesmente peroxinitrito (KOPPENOL, 1998a; RADI, 2000; RADI et al., 2001).

A velocidade de formação do peroxinitrito ( $k = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) transcorre a valores extremamente elevados, ou seja, a velocidade constante próxima ao limite de difusão (relembrando que a velocidade de difusão próxima ao limite também ocorre na reação entre o radical hidroxila e algum alvo biológico, e tem o valor da velocidade de  $k = 10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Portanto, a velocidade de formação do

peroxinitrito é cerca de três vezes maior que a velocidade de reação para o catabolismo do radical ânion superóxido através da superóxido dismutase (SOD) (KOPPENOL, 1998a; NAPOLI et al., 2006).

O peroxinitrito é uma espécie reativa com tempo de meia-vida curto (aproximadamente 0,05 - 1 segundo). Possui propriedades citotóxicas e está relacionado em muitas doenças humanas. Além de seu potencial oxidante para muitos alvos biológicos, esta espécie pode provocar danos a um número muito maior de moléculas biológicas, uma vez que a decomposição do ácido peroxinitroso (ONOOH) pode gerar o radical hidroxila independente da catálise mediada pela presença de metais de transição no meio reacional (GUTTERIDGE, 1994; VAN DER VLIET et al., 1995; RADI, 2000).



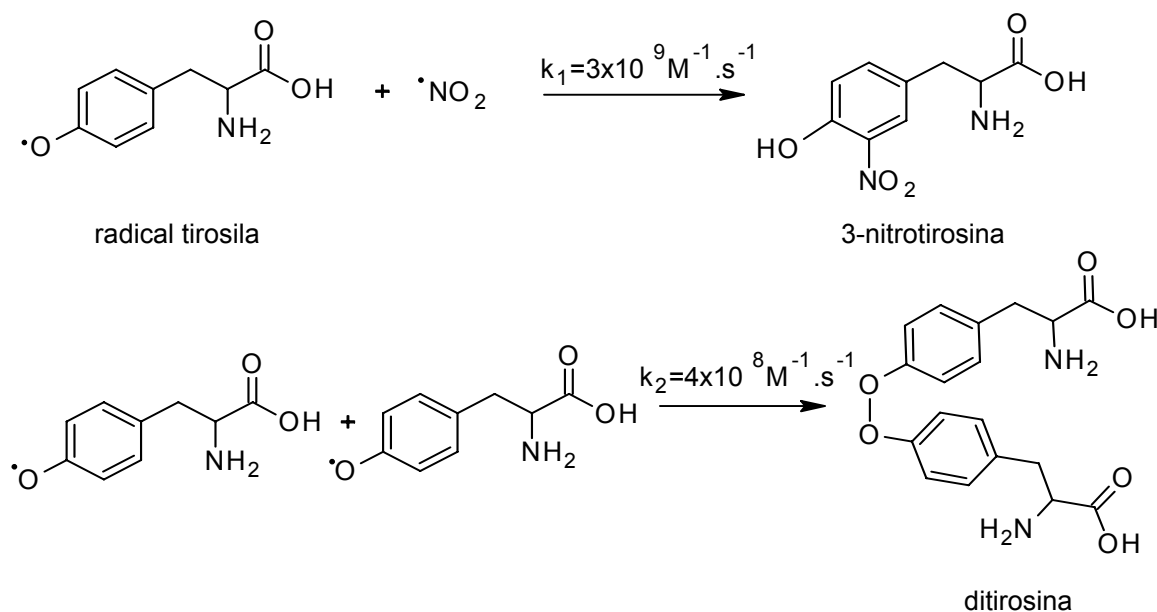
**Figura 10.** Equações de formação e decomposição do ONOO<sup>-</sup>/ONOOH. Radical ânion carboxilato (<sup>•</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup>); ânion peroxicarboxilato (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>); nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>); ácido peroxinitroso (HONOO); radical dióxido de nitrogênio (<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>); radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>); radical monóxido de nitrogênio (<sup>•</sup>NO); e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (adaptado de STANBRO, 2000a; STANBRO, 2000b; STANBRO, 2000c).

**Tabela 8.** Velocidade das reações (adaptado de STANBRO, 2000a; STANBRO, 2000b; STANBRO, 2000c).

Reação	Equação	Constante de velocidade
1	$\bullet\text{NO} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^-$	$k_1 = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
2	$\text{ONOO}^- \rightarrow \bullet\text{NO} + \text{O}_2^{\bullet-}$	$k_2 = 0,0017 \text{ s}^{-1}$
3	$\text{ONOO}^- \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{OH}$	$k_3 = 0,207 \text{ s}^{-1}$
4	$\text{HONOO} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	$K_4 = 0,483 \text{ s}^{-1}$
5	$\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ONOOCO}_2^-$	$K_5 = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
6	$\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{CO}_3^-$	$K_6 = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
7	$\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{CO}_2$	$K_7 = 7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$

Em pH neutro, o  $\text{ONOO}^-$  é parcialmente protonado, formando ácido peroxinitroso ( $\text{HONOO}$ ) que se decompõe rapidamente, produzindo o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e intermediários reativos como o radical hidroxila e o radical dióxido de nitrogênio. Tanto a forma aniônica quanto a protonada podem atravessar as biomembranas por diferentes mecanismos, difundindo em uma distância de 10-20  $\mu\text{m}$  (KOPPENOL, 1998a; RAD, 2000; STANBRO, 2000a; STANBRO, 2000b). Ao atravessar as biomembranas, provoca reações em cadeia, promovendo a lipoperoxidação e a oxidação de proteínas. Devido à capacidade de iniciar a peroxidação lipídica (LPO) em lipoproteínas de baixa densidade (*LDLs*) o  $\text{ONOO}^-$  tem forte relação com o desenvolvimento da placa aterosclerótica ou ateroma. Pode ainda reagir diretamente com metaloproteínas, grupamentos tióis e com algumas biomoléculas, tais como a oxi-hemoglobina,  $\text{CO}_2$ , e albumina sérica com velocidade constante, respectivamente, de  $1 \times 10^4$ ;  $4 \times 10^4$ ; e  $9,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (KOPPENOL, 1998a; KOPPENOL, 1998b; RAD, 2000; STANBRO, 2000a; STANBRO, 2000b).

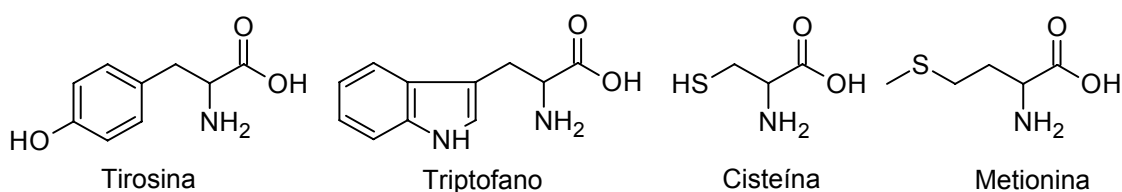
O peroxinitrito pode hidroxilar e nitrar substâncias que contenham em sua estrutura química anéis aromáticos. Um aminoácido que sofre o processo de nitração por  $\text{ONOOH}$  via formação do radical dióxido de nitrogênio é a tirosina (figura 11).



**Figura 11** Radical tirosina ( $\text{Tir}^\bullet$ ) e a reação de formação da nitrotirosina (3-NT) e de ditirosina (adaptado de VAN DER VLIET et al., 1995).

A reação entre tirosina e  $\text{ONOO}^-$  produz a 3-nitrotirosina (3-NT) e a ditirosina, indicando a intermediária formação de radicais tirosilas no processo dependente de pH, e concomitantemente, a formação do intermediário  $\text{ONOOH}$  (VAN DER VLIET et al., 1995).

Estudos iniciais desenvolvidos por Radi e colaboradores (1994) relataram a interferência do  $\text{ONOO}^-$  na função mitocondrial, alterando a homeostase celular. Porém, em baixas concentrações o peroxinitrito tem a mesma atividade biológica do  $\cdot\text{NO}$ . Contudo, em altas concentrações exerce um efeito citotóxico, resultando na modificação das proteínas e alteração da atividade enzimática, pela nitração dos resíduos de aminoácidos de triptofano e tirosina, e a oxidação de cisteína e metionina (figura 12) (VAN DER VLIET et al., 1995; RADI et al., 2000; RADI, 2003).



**Figura 12.** Estrutura dos principais aminoácidos reativos ao  $\text{ONOO}^-$

A formação de nitrotirosina (NT) é reconhecidamente um indicador de dano aos sistemas biológicos. Alguns autores relacionam a participação do peroxinitrito em muitas doenças, tais como neurodegeneração (Mal de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica), inflamação (articular, intestinal e septicemias) e vascular (hipertensão arterial e aterosclerose), entre outras (KOPPENOL, 1998b; RADI, 2000; RADI et al., 2001; RADI, 2003).

#### 2.9.1.5.2 A oxidação de hemeproteínas

A molécula de óxido nítrico tem afinidade química para reagir com os grupamentos heme e tióis de muitas proteínas e enzimas, formando um complexo nitrosilo-hemeproteína ou NO-hemeproteína ou ainda, hemeproteína nitrosilada.

Diversas hemoproteínas são encontradas em nosso organismo, entre as quais podemos citar a citocromo P450, a mieloperoxidase, a guanilato ciclase, a citocromo C, a mioglobina e a hemoglobina. Tal característica oxidante envolve sua propriedade em atuar como segundo mensageiro, ativando a guanilato ciclase (que possui ferro como cofator do sítio catalítico) e como agente redutor de hemoglobinas e mioglobinas. Aliás, esta propriedade foi utilizada para identificar o fator relaxante derivado do endotélio como o  $\cdot\text{NO}$ , pois, ambas as reações apresentaram similaridades. Portanto, o relaxamento em células vasculares da musculatura lisa obtido com  $\cdot\text{NO}$  pode ser antagonizado pela adição de hemoglobina ou meta-hemoglobina. Logo, uma das propriedades fisiológicas da hemoglobina e/ou mioglobina seria a regulação da concentração de  $\cdot\text{NO}$  através da atividade sequestradora do radical (IGNARRO, 1989; GROSS, 1996; WINK; MITCHEL, 1998).

O tempo de meia-vida para reação entre o  $\cdot\text{NO}$  e a oxi-hemoglobina é aproximadamente 5 segundos. Mesmo durante este tempo, a molécula consegue difundir-se pelas células e atuar como um segundo mensageiro. Além disto, devido à solubilidade de seis a sete vezes maiores em fase orgânica que em fase aquosa, alguns autores, inicialmente, sugestionaram o papel das membranas como possíveis reservatórios desta molécula.

Embora seja um radical livre, o óxido nítrico não é uma molécula muito reativa, portanto, apresenta certa estabilidade. Entretanto, em condições em que o oxigênio esteja dissolvido, pode causar alguns efeitos danosos ligando-se ao ferro (II) do citocromo c oxidase e a outras hemoproteínas, transformando a oxi-hemoglobina e oximioglobina em suas respectivas formas oxidadas “meta”, sendo incapazes de transportarem o oxigênio, e produzindo  $\text{NO}_3^-$  (IGNARRO, 1989; KNOWLES; MONCADA, 1994; KOPPENOL, 1998b;).



#### **2.9.1.6 O radical ânion ascorbila ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ )**

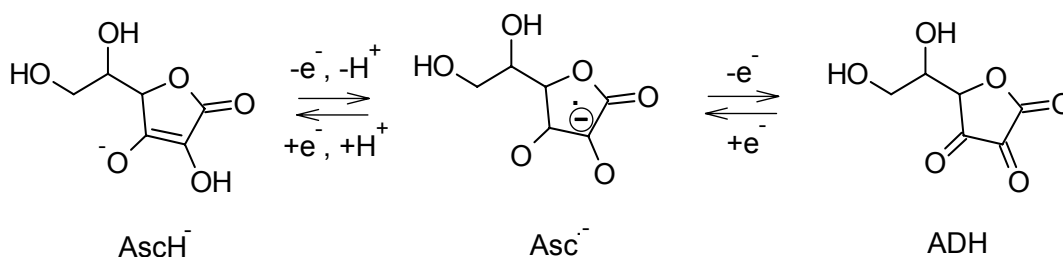
Durante a atividade antioxidante, o ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ), proveniente do ácido ascórbico ( $\text{AscH}_2$ ) sofre duas consecutivas oxidações, cada uma, relacionada à



perda de um elétron, gerando uma espécie radicalar intermediária denominada de radical ascorbila ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ), até a obtenção do produto final da reação o ácido dehidroascórbico (ADH) (HUBEL et al., 1997).

O radical ascorbila ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ) possui um longo tempo de meia-vida comparado aos outros radicais, tendo o valor de 50 segundos (GALLEANO et al., 2002)

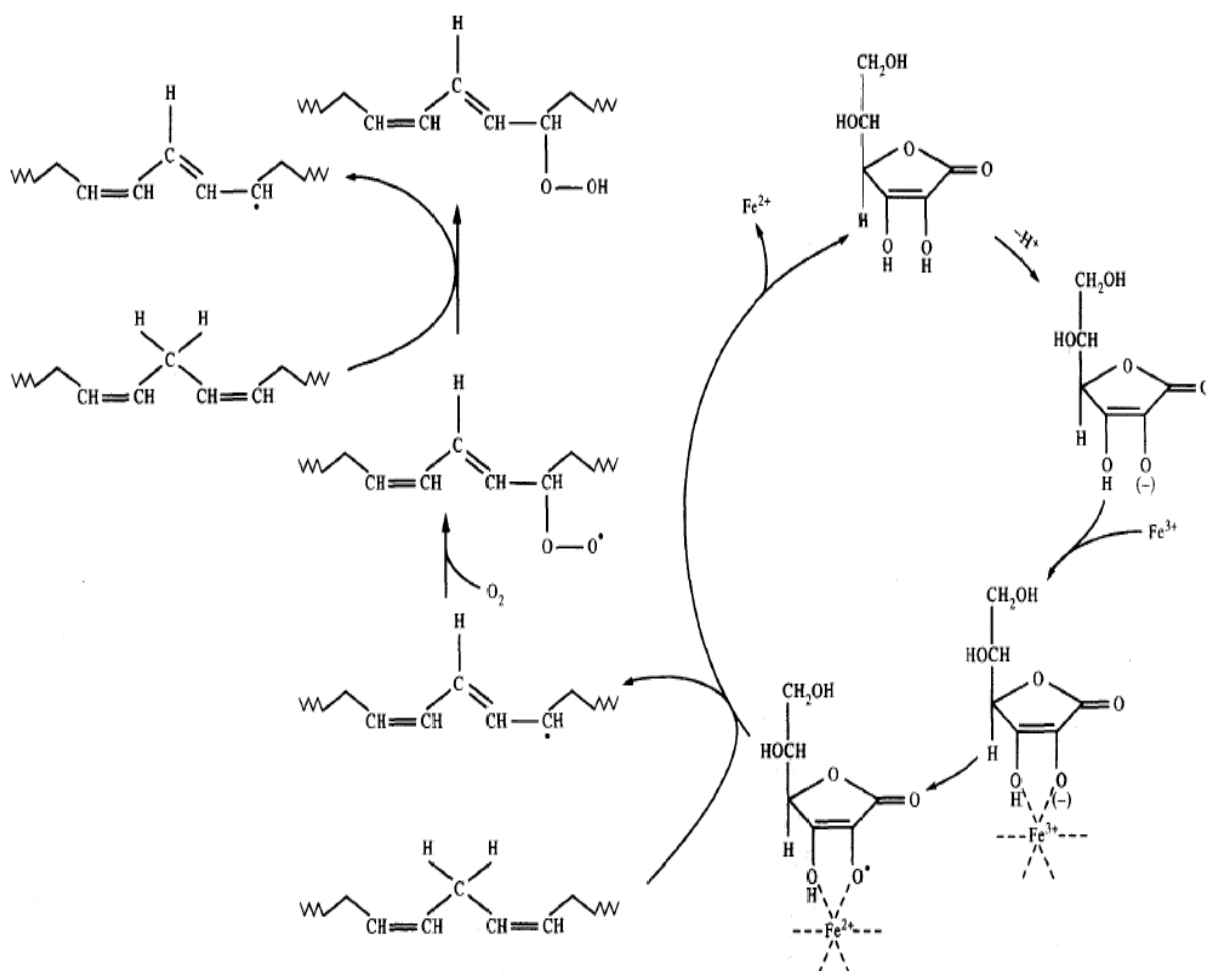
Embora o processo de peroxidação lipídica (LPO) seja conhecido há anos, o mecanismo pelo qual é iniciado ainda permanece incerto. Uma hipótese sustentada por muitos pesquisadores, é que dentre as EROs, principalmente o radical hidroxila produzido pela reação de Fenton, seja a mais potente espécie oxidante de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs, no inglês: *PUFAs*). Contudo, a adição de SOD, catalase e outros sequestradores de promotores da geração de radical hidroxila falham em inibir a LPO. Isto sugere que a iniciação da LPO pode ser gerada por outras espécies reativas, que não as EROs. Outros autores chamam a atenção para a proporção entre os íons ferrosos e íons férricos no sistema, além de suas interconversões ( $\text{Fe}^{+++} \leftrightarrow \text{Fe}^{++}$ ) serem fatores determinantes para a iniciação da LPO (BRAUGHLER et al., 1986). Para tanto, se estabelece que a catálise promovida por ascorbato, gerando a LPO, pode estar relacionada à habilidade do ascorbato em reduzir os íons férricos em íons ferrosos.



**Figura 13.** Reação de oxidação do ascorbato. Ascorbato:  $\text{AscH}^-$ ; radical ascorbila:  $\text{Asc}^{\bullet-}$ ; Ácido dehidroascórbico: ADH. Em pH fisiológico a forma ácida é fortemente ionizada porque o pKa do ácido ascórbico é 4,25 (adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999)

Ensaio utilizando microssomas evidenciam a formação de um complexo entre o ferro microssomal (endógeno) e ascorbato (figura 14). Esta hipótese é suplementada pelos conhecimentos de que pequenas quantidades de ferro ligado à

membrana podem formar um complexo entre o íon ferroso e o radical ascorbila iniciando a lipoperoxidação (CASALINO et al., 1996).



**Figura 14.** Mecanismo hipotético de iniciação da peroxidação lipídica promovida pela presença de ascorbato e ferro microssomal (adaptado de CASALINO et al., 1996).

## 2.10. Os lipídios de membrana

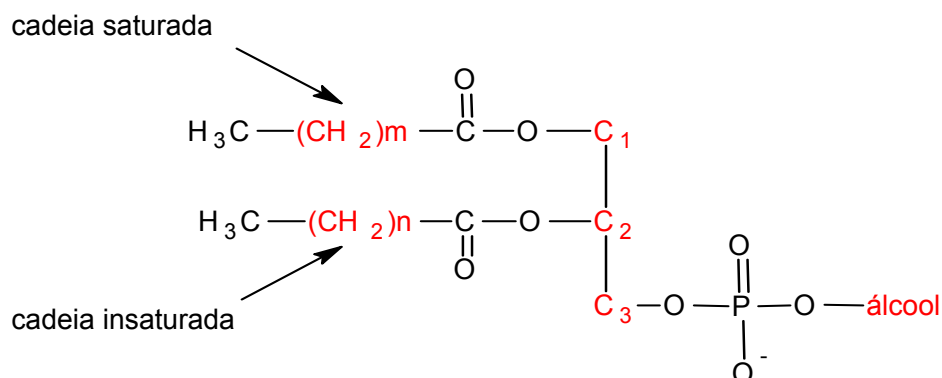
Todas as células possuem membrana lipídica, sendo, portanto um elemento básico dos organismos vivos. Os lipídios de membrana são macromoléculas que apresentam estrutura química com uma extremidade polar (hidrófila) e a outra não polar (hidrófoba), conferindo uma propriedade anfipática. Por serem estruturas

grandes, em solução aquosa, se dispersam, formando micelas, conferindo um comportamento próprio à cada molécula, quanto a sua solubilidade (MORRISON; BOYD, 2005).

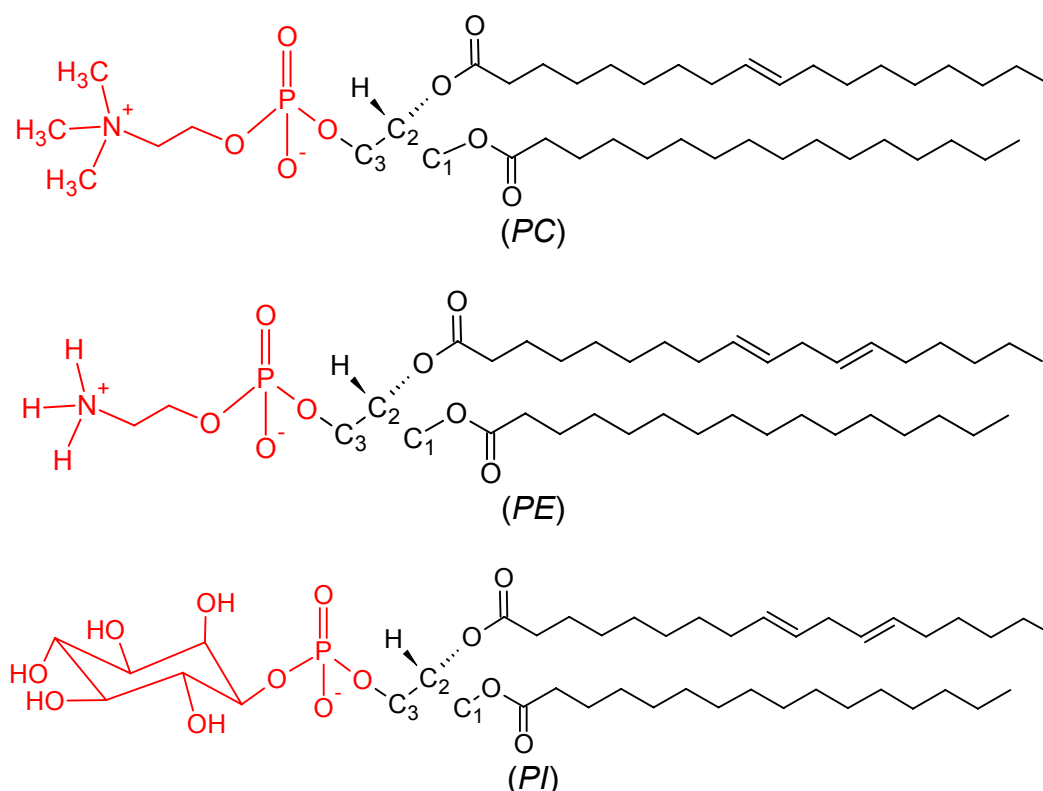
Existem várias classes de lipídios, entre eles, citam-se os fosfolipídios, os esfingolipídios, os glicolipídios e os esteróis. Entre os principais lipídios estruturais de membranas, os fosfolipídios e fosfoglicerídeos são os mais abundantes. Nas células eucariontes, a presença de fosfatidilcolina na constituição das membranas é predominante (LIMA; ABDALLA, 2001).

A estrutura química dos fosfolipídios caracteriza-se por conter duas cadeias longas (parte lipofílica) unidas por esterificação ao carbono 1 (cadeia saturada) e ao carbono 2 (cadeia insaturada) do triacilglicerol ou triglicerídeos. O carbono 3 apresenta uma ligação éster com um grupo fosfato, conferindo a denominação de glicerofosfolipídios. Este grupamento fosfato encontra-se unido pelo grupamento álcool, resultando na quarta ligação éster da molécula.

A porção terminal tem característica hidrófila e, geralmente, carga dipolar iônica (zwiteriônica), sendo uma negativa e a outra positiva. Contudo, outros tipos de fosfolipídios podem apresentar estruturas carregadas negativamente ou positivamente, dependendo do grupamento terminal. Estes fatores podem afetar tanto as características químicas, quanto as propriedades físicas relacionadas às membranas, à sua organização e à interação no ambiente (DELATTRE et al., 1993; DE LIMA, 2004; MORRISON; BOYD, 2005).

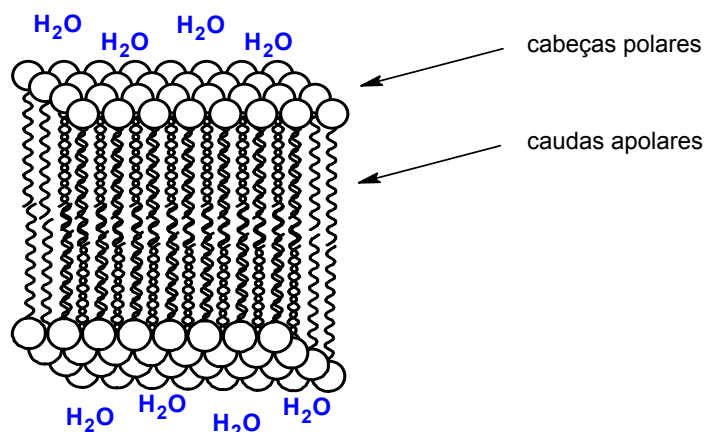


**Figura 15.** Estrutura do fosfoglicerídeos (adaptado de DELATTRE et al., 1993).



**Figura 16.** Diferentes estruturas dos fosfolipídios e suas cargas predominantes. Fosfatidilcolina (PC) = carga neutra (zwitteriônico); fosfatidiletanolamina (PE) = carga neutra (zwitteriônico); fosfatidilinositol (PI) = carga negativa (adaptado de DELATTRE et al., 1993; DE LIMA, 2005; MORRISON; BOYD, 2005).

Em certas condições, os fosfolipídios formam as duplas camadas ou bicamadas, arranjando-se de forma que as estruturas de suas caudas apolares alinham-se numa interação apolar (cauda com cauda, ou seja: onde atuam forças de van der Waals); e as extremidades polares são projetadas às superfícies da estrutura, interagindo com a água. O efeito da interação lipofílica deste sistema gera uma barreira efetiva à passagem de moléculas polares e íons, conferindo permeabilidade seletiva às células. Logo, a integridade da membrana, também afeta a viabilidade celular, uma vez que a compartimentalização do ambiente interno da célula é essencial para manter a homeostase celular.



**Figura 17.** Estrutura em bicamada de fosfolípidios.

### 2.10.1 A peroxidação lipídica (LPO)

A reação de oxidação mediada por EROs e ERNs sobre os componentes biológicos lipídicos, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados constituintes das membranas biológicas e de lipoproteínas pode ser definida como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CASTELLI et al. 1997; LIMA; ABDALLA, 2001; TSERNG, GRIFFIN, 2003; RIBEIRO et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

O processo de LPO envolve uma cascata de eventos bioquímicos, gerando a produção de espécies reativas intermediárias como radical alquila ou radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ); radical alcóxila ( $LO^{\bullet}$ ) e radical peróxila ou também chamado de radical peróxila lipídico, ou ainda, radical peroxilipídico ( $LOO^{\bullet}$ ). Estes radicais lipídicos podem atacar substratos intactos (lipídeos não oxidados), em uma reação em cadeia. Ainda, outras duas espécies são descritas nas formas de endoperóxido e hidroperóxido ( $LOOH$ ). Consultar figura 19 no texto.

A ação destes radicais livres sobre os alvos moleculares, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados pode afetar a estrutura química do substrato, alterando a conformação estrutural da membrana, o equilíbrio nos mecanismos de trocas metabólicas (permeabilidade), a fluidez da membrana e a atividade enzimática na membrana. Como resultado, há a perda da homeostase celular e em condições extremas provoca a morte celular. Entretanto, estes radicais livres podem

atuar em processos fisiológicos como na geração de eicosanóides, na fagocitose e em diversas vias de transdução de sinais (CASTELLI et al. 1997; LIMA; ABDALLA, 2001).

A propriedade que as EROs e as ERNs têm de reagir com os ácidos graxos poliinsaturados, servindo como iniciadores do processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) está diretamente relacionada com uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e o processo de envelhecimento. Além disto, a LPO também tem sido relacionada à degradação de alimentos, à toxicidade de drogas e aos danos provocados pela poluição ambiental e pela luz solar. De fato a exposição da pele a radiação UV aumenta a produção de espécies reativas, sendo responsável pelos danos à pele, degradando principalmente os lipídios (YAMAGUCHI et al. 2005).

O índice de LPO *in vivo* pode ser avaliado e relacionado aos eventos celulares como a expressão de genes, a proliferação celular e a apoptose, sendo também, utilizado como um indicador do estresse oxidativo (CASALINO et al., 1996; CASTELLI et al. 1997; STANBRO, 2000a; LIMA; ABDALLA, 2001; TSERNG; GRIFFIN, 2003; ROGINSKY; LISSI, 2005; LAGUERRE et al., 2007).

A LPO exerce seu potencial citotóxico a partir da perturbação da homeostase celular. Este processo é decorrente das alterações na permeabilidade, no fluxo iônico e de outras substâncias, resultando, na perda de seletividade, seja no influxo de nutrientes e/ou efluxo de substâncias tóxicas, em alterações ao DNA, na oxidação de lipoproteínas (LDL) e no comprometimento das moléculas pertencentes à matriz extracelular (colágeno, elastina e proteoglicanos) (LIMA; ABDALLA, 2001).

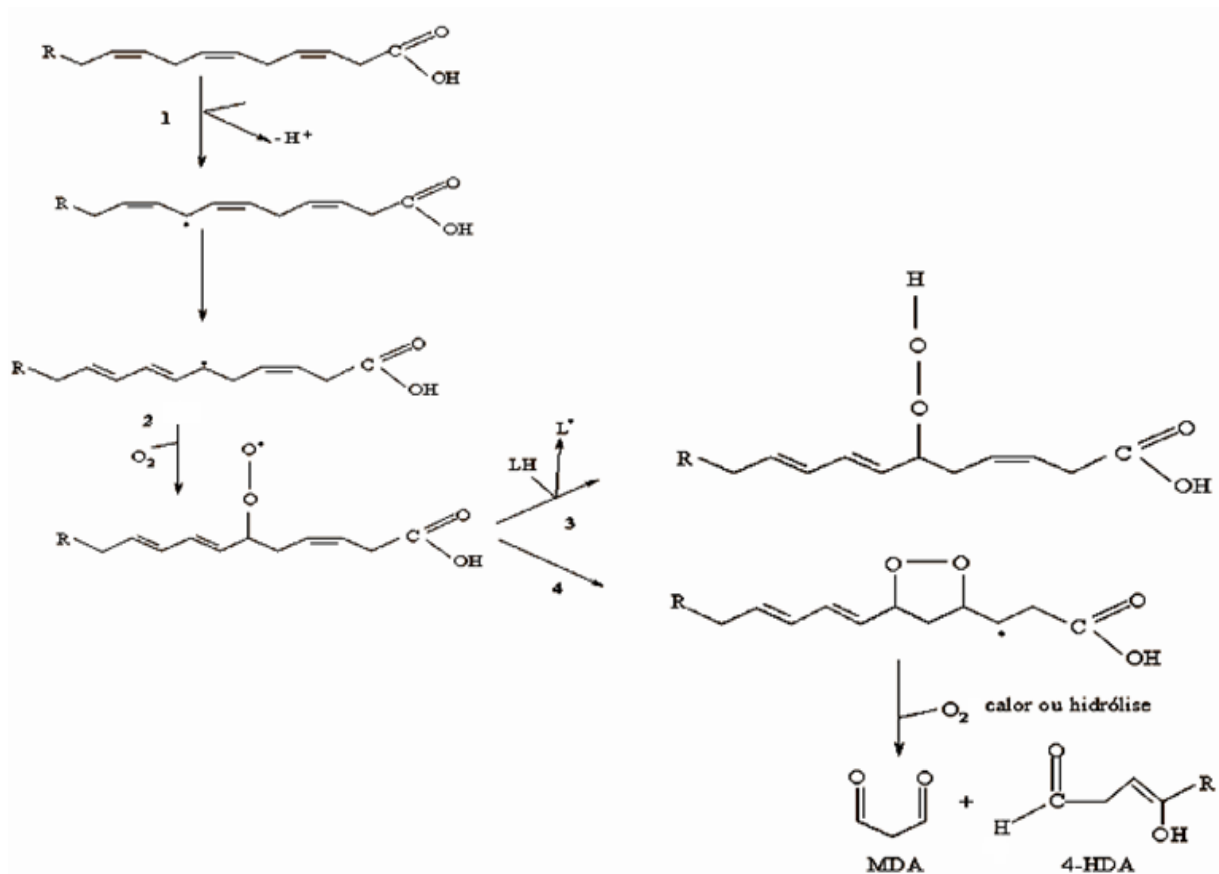
A produção de hidroperóxidos – produto primário da lipoperoxidação em sistemas biológicos pode ocorrer através de duas vias:

- (1) Via enzimática pela atividade das lipoxigenases e cicloxigenases;
- (2) Via não enzimática, envolvendo a participação de EROs e ERNs e metais de transição.

Ambas as vias estão fundamentadas na incorporação do oxigênio molecular ao AGPI. O oxigênio necessário para que ocorra a LPO deve estar na forma ativada, sendo que no estado fundamental o oxigênio encontra-se no estado tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). Portanto, a reação do oxigênio no estado tripleto com os ácidos graxos poliinsaturados é limitada devido à restrição de spins, o que não ocorre no caso do

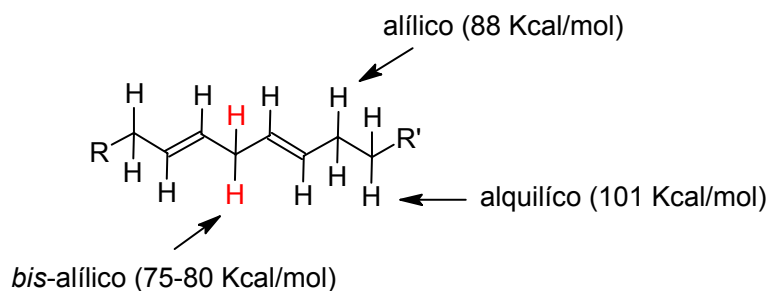
oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) ou parcialmente reduzido, exemplo:  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^{\cdot}\text{OH}$ ,  $\text{ONOO}^-$  ou parcialmente ativado como no complexo oxigênio-ferro.

A lipoperoxidação ocorre em três etapas distintas, sendo elas: (1) Iniciação; (2) Propagação; (3) Terminação (figura 18).



**Figura 18.** Processo de LPO. Em que: 1: abstração do hidrogênio; 2: reação com oxigênio molecular e formação de radical peroxila; 3: formação de uma espécie radical centrada no carbono; e 4: formação de endoperóxido e produtos: MDA: malondialdeído e 4-HDA: 4-hidróxi-alcenais (adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

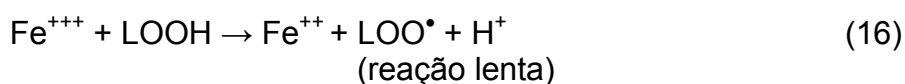
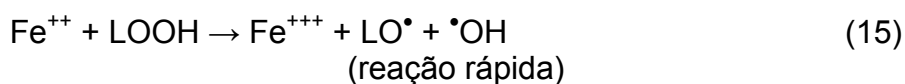
A etapa de iniciação é descrita como o início da peroxidação, sendo que o AGPI sofre ação de uma ER o suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio *bis*-aliílico a partir de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), formando um radical de carbono (figura 19) (VANNUCCHI, et al, 1998; LIMA; ABDALLA, 2001).



**Figura 19.** Estrutura do AGPI. Em vermelho, os hidrogênios que são alvos da ação de espécies reativas e radicalares. Entre parênteses, os valores da energia de ligação das ligações entre C e H (adaptado de DE LIMA, 2005).

Uma vez formado, o radical alquila sofre rearranjo molecular, produzindo um dieno conjugado (molécula química que possui o intercalamento de ligações simples e duplas) como forma de estabilizar-se. A etapa de propagação ocorre em ambiente aeróbico e o radical alquila passa a incorporar o oxigênio molecular, produzindo o radical peroxila. Conseqüentemente, este radical pode abstrair outro hidrogênio alílico de outro ácido graxo poliinsaturado, gerando um hidroperóxido. Alguns peróxidos cíclicos são formados em decorrência da reação do radical peroxila e uma dupla ligação da mesma cadeia de AGPI. Esses peróxidos cíclicos também são importantes na etapa de propagação da LPO.

A participação de metais de transição, entre eles: ferro e cobre, no processo de LPO diminuem a energia de ativação para a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila e hidroxila, a partir da degradação dos hidroperóxidos, atuando desta forma, como catalisadores da reação (KEHRER, 1993; LIMA; ABDALLA, 2001).



O passo seguinte à propagação é chamado de etapa de terminação e se encerra com a formação de produtos não radicalares. Muitos produtos secundários a LPO podem ser formados, entre eles, aldeídos e os derivados: hidróxi-, ceto-, cetohidróxi- e epóxi-hidróxi-ácido graxo (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIMA; ABDALLA, 2001; ROGINSKY; LISSI, 2005).



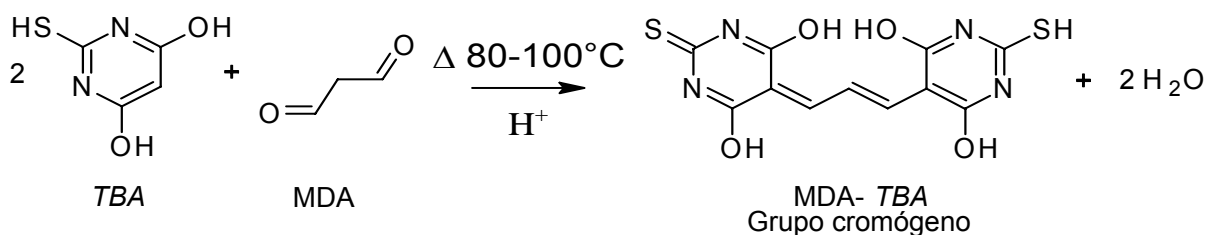
Em relação à oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados promovida por sistemas enzimáticos, podemos citar a participação das peroxidases ou monoxidases; as dioxigenases e o sistema mieloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/haletos.

Neutrófilos e monócitos, durante o processo de fagocitose, são capazes de, por intermédio da enzima mieloperoxidase – uma hemoproteína – provocar a LPO. O sistema mieloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/haletos é responsável pela produção de espécies reativas e radicalares como o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, <sup>•</sup>NO, ácido hipocloroso (HOCl) e ONOO<sup>-</sup>. Todas estas espécies têm a capacidade de abstrair o hidrogênio alílico relacionado à lipoperoxidação.

As lipoxigenases são enzimas citosólicas e microsossomais que catalisam a produção de hidroperóxidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados. Estas enzimas possuem grande afinidade em reagir com os ácidos graxos dioxigenados, tais como: o ácido linoléico, o eicosapentaenóico, o ácido araquidônico, entre outros. Um exemplo de reação é conversão do ácido araquidônico em leucotrienos.

Existem outras enzimas, em tecidos animais, denominadas de ciclooxigenases (COX) que são responsáveis por inserir o oxigênio ao ácido araquidônico, produzindo as prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina. Prostaglandinas e leucotrienos mediam importantes processos fisiológicos e imunológicos. Fisiologicamente, as COXs são as maiores produtoras de radicais peroxilipídicos, participando ativamente da sinalização celular (WINK; MITCHEL, 1998; LIMA; ABDALLA, 2001)

Uma das técnicas mais populares para a determinação da oxidação de lipídios é a determinação do produto final da reação: o malondialdeído ou malonildialdeído (MDA). A introdução deste método para determinação da LPO foi em 1944 por Kohn e Liversedge, tornando-se um método simples e barato, porém, de pouca especificidade. O MDA é um aldeído formado como produto secundário durante a oxidação de AGPIs por cisão beta dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados. Este produto tem características físico-químicas como: volatilidade, baixo peso molecular (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>; PM = 72,02) e pKa 4,46. Em condições favoráveis, como pH ácido e aquecimento (80-100 °C) o MDA reage com agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A condensação com o ácido tiobarbitúrico (*TBA*) e formação do produto róseo MDA-*TBA* na proporção de 1:2 pode ser monitorada através da absorção no espectro visível com comprimento de onda de 532 nanômetros.



**Figura 20.** Reação de condensação do MDA e TBA.

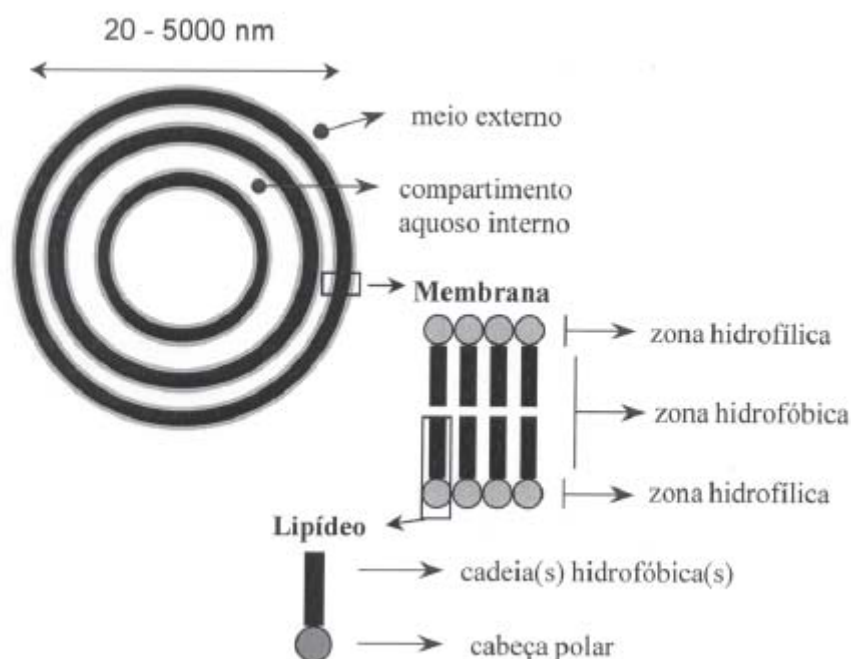
Esta reação tornou-se muito conhecida pelo nome de: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *TBARS*), e representa a maioria dos métodos que utilizam o TBA como agente cromógeno (LIMA, ABDALLA, 2001; ROGINSKY; LISSI, 2005), aplicando-se à determinação da extensão da LPO em amostras biológicas e em ensaios *in vitro* como método útil e satisfatório.

## 2.10.2 Os modelos de membrana

### 2.10.2.1 Os lipossomas

Lipossomas são estruturas interessantes e amplamente utilizadas como modelo de membrana biológica devido à similaridade com as membranas celulares (CASTELLI et al. 1997; FRÉZARD et al. 2005). Apresentam-se em forma de vesículas esféricas, possuindo uma ou várias membranas lipídicas dispostas em bicamadas concêntricas (figura 21).

Estas bicamadas são responsáveis por criar um ou vários compartimentos aquosos no meio interno, isolando-os do meio externo. A utilização de lipossomas como modelo e membrana deve-se a vantagem em controlar os fatores inerentes as suas propriedades físico-químicas relacionadas à composição lipídica, ao tamanho, à lamelaridade e à superfície (CASTELLI et al.; 1997; FRÉZARD et al., 2005).



**Figura 21.** Característica estrutural dos lipossomas, exemplo de vesícula multilamelar (adaptado de FRÉZARD et al., 2005).

Entre os tipos mais comuns de lipossomas, podemos citar: as vesículas multilamelares (do inglês *MLV*) e as vesículas grandes unilamelares (do inglês *LUV*) e as vesículas pequenas unilamelares (do inglês *SUV*) (CASTELLI, et al. 1997; SAMUNI et al., 2005).

**Tabela 9.** Classificação dos principais tipos de lipossomas. *MLV*: vesículas multilamelares; *LUV*: vesículas grandes unilamelares; *SUV*: vesículas pequenas unilamelares (LICHTENBERG; BARENHOLZ, 1988).

Tipo (abreviação)	Diâmetro da vesícula (nm)
<i>MLV</i>	> 400
<i>LUV</i>	entre 50 – 400
<i>SUV</i>	< 50

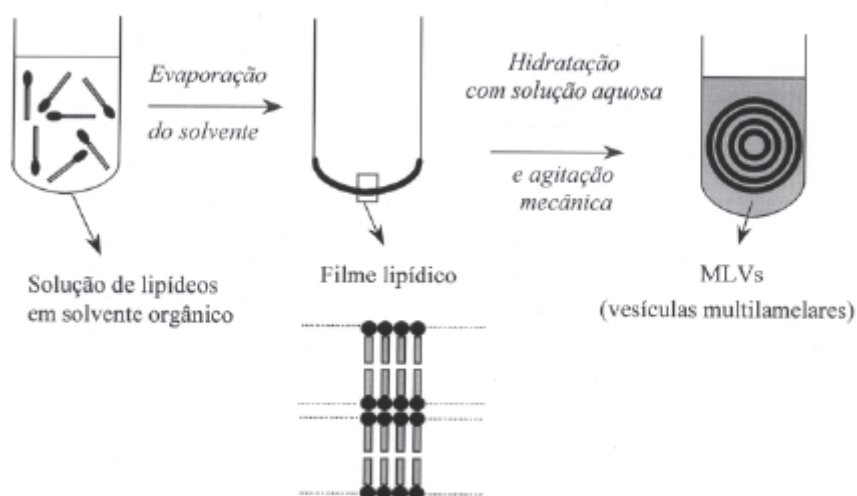
Os lipossomas são obtidos a partir de uma substância anfifílica formadora de fase lamelar, geralmente fosfatidilcolina. Lipídeos apresentando carga efetiva

negativa ou positiva podem também ser incluídos na composição da membrana, influenciando a taxa de incorporação de substâncias antioxidantes, impedindo a agregação/fusão das vesículas lipídicas, modulando o seu destino no organismo, assim como, alterando a velocidade de difusão de muitas moléculas, entre elas os radicais livres.

A produção de ambos requer diversos tipos de procedimentos, sendo que as *LUVs* são produzidas principalmente, por extrusão (figura 22) e diálise, sendo comumente aceitos como modelo apropriado para os ensaios de lipoperoxidação *in vitro*. As *MLVs* são facilmente produzidas por hidratação e agitação (figura 23), sendo etapas que precedem a produção das *LUVs* (CASTELLI, et al. 1997; SAMUNI et al., 2005).



**Figura 22.** Imagem (a): sistema de extrusão utilizado para a produção de *LUVs* a partir das *MLVs*. Imagem (b): estrutura da vesícula grande unilamelar (*LUV*) (adaptado de DE LIMA, 2005).



**Figura 23.** Método de hidratação para obtenção de lipossomas do tipo *MLVs* (adaptado de FRÉZARD et al., 2005).

### **2.10.2.2 Os microsomas (MC)**

Membranas microsomais são preparadas por centrifugação diferencial a partir do homogenato de tecido animal, utilizando, principalmente órgãos como fígado e pulmão. Estas vesículas contêm uma mistura complexa de retículo endoplasmático (RE), membrana plasmática e membranas de organelas. Seu conteúdo apresenta uma quantidade variável e complexa de ácidos graxos, proteínas, antioxidantes endógenos e sistemas enzimáticos.

Entre os ácidos graxos, descreve-se a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, o fosfatidilinositol, a fosfatidilserina, os esfingolipídios e o colesterol. Entre os antioxidantes, cita-se o  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno. E em relação aos sistemas enzimáticos relata-se a atividade da NADPH-citocromo P-450 redutase, a xantina oxidase e a NADPH oxidase (PUNTARULO; CEDERBAUM, 1988; HALLIWELL, 1995)..

A hemoproteína citocromo P-450 presente no RE é classificada como uma enzima monoxigenase que promove reações de biotransformação, produzindo a hidroxilação ou carbonilação de substâncias xenobióticas, utilizando os co-substratos:  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ou  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  (PUNTARULO; CEDERBAUM, 1988; VASCONCELOS et al., 2007). A atividade de biotransformação por esta hemoproteína ocorre somente para substâncias orgânicas e relativamente insolúveis (LEHNINGER, 1986).

Indubitavelmente, a riqueza de critérios para o estudo da lipoperoxidação requer a comparação no emprego de diferentes modelos de membrana, da composição da matriz lipídica, da análise dos distintos mecanismos de ação antioxidante e dos mecanismos iniciadores da reação em cadeia por diferentes espécies reativas (HALLIWELL, 1995).

## **2.11 A viabilidade e respiração celular**

A membrana plasmática mantém a integridade da célula porque promove a constância do equilíbrio dinâmico intracelular, regulando o fluxo de íons e de

moléculas através da permeabilidade seletiva e mantendo uma diferença de potencial elétrico através da membrana. Esta condição é primordial para a homeostase celular e influencia diretamente a viabilidade da célula.

Nos organismos aeróbicos a glicólise é responsável pelo fornecimento de energia em animais, vegetais e microorganismos, sendo apenas o primeiro estágio da degradação aeróbica da glicose até a formação dos produtos finais do processo: o  $\text{CO}_2$  e a  $\text{H}_2\text{O}$ . Uma das etapas seqüenciais deste processo de respiração celular é a ciclo do ácido cítrico. Nele o grupo acetil coenzima A é completamente oxidado, gerando a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , de forma dependente do oxigênio molecular.

No ciclo do ácido cítrico, os grupos acetil são enzimaticamente degradados, produzindo átomos de hidrogênio. Todas as desidrogenases que participam da oxidação do piruvato e do ciclo do ácido cítrico nas células eucariontes estão localizadas na mitocôndria, embebidas na matriz mitocondrial.

Na etapa final, chamada de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, os átomos de hidrogênio são separados em prótons e elétrons ricos em energia. Estes elétrons são transferidos por uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons – cadeia respiratória – até a obtenção da ATP e de  $\text{H}_2\text{O}$  e a partir da redução do oxigênio molecular (LEHNINGER, 1986). Qualquer interferência nas etapas sucessivas da respiração celular pode comprometer a função celular.

## 2.12 A metaloterapia antitumoral

O sucesso da cisplatina e dos complexos de platina em atuarem como agentes antitumorais estimularam a pesquisa de outros complexos contendo centros-ativos metálicos como quimioterápicos (TRYNDA-LEMIESZ, 2004; GUICHARD et al. 2006; LIU, et al. 2007). Entre todos os complexos antitumorais desenvolvidos, baseado no rutênio, o ligante dimetilsulfóxido (DMSO) demonstrou maior potencial devido à sua seletividade para a metástase do tumor sólido e menor toxicidade ao indivíduo. Neste contexto, o complexo de rutênio denominado de NAMI-A ( $\text{H}_2\text{Im}[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO-S})(\text{HIm})]$ ) tem finalizado os estudos clínicos de fase 1 com resultados promissores (ALESSIO et al., 1989; SAVA et al., 1999; SAVA et al., 2002; BACAC et al., 2004).

Diferente do mecanismo de ação da cisplatina e de seus derivados, que se ligam exclusivamente ao *DNA*, os complexos de rutênio fornecem uma capacidade adicional demonstrando uma atividade antimetastática. Ensaios *in vitro* com linhagens celulares de carcinoma ovariano humano (A2780) e de células resistentes à cisplatina (A2780rescis) apresentaram significativa redução da proliferação celular determinada em 24 horas pelo método de MTT, utilizando o NAMI-A como agente na concentração de 1 mM. O NAMI-A também afetou o ciclo celular de células de carcinoma de boca humano (KB) e células metastáticas de murinos (metGM) interrompendo a fase G2/M. Entretanto, NAMI-A apresenta variações da sua potencial atividade devido:

- a) à presença e concentração das espécies no meio;
- b) às características intrínsecas do complexo e de seus ligantes, relacionando a efetividade com o tipo de hidrólise e a formação de aqua-complexos reativos;
- c) à estabilidade dependente de pH;
- d) à toxicidade renal demonstrada *in vivo*, utilizando camundongos Swiss CD1 (SAVA et al., 2002; BACAC et al. 2004).

### **2.13. Os complexos sintéticos**

A pesquisa sobre substâncias sintéticas, especialmente os complexos nitrosilados de rutênio é apenas uma das estratégias para produção e desenvolvimento de metalofármacos. Contudo, é preciso maior entendimento sobre o balanço pró-oxidante e antioxidante na célula e as relações existentes entre o estado redox e a expressão gênica. Considerando os aspectos descritos, um estudo sobre a atividade antioxidante é aqui proposto, de modo a permitir o maior controle das variáveis inerentes ao método *in vitro*. Neste sentido, seguem-se estudos complementares *in vitro* relativos à atividade antitumoral e a viabilidade celular.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo central deste estudo é avaliar a propriedade antioxidante de 5 diferentes complexos nitrosilados de rutênio com ligantes orgânicos, *trans*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L(NO)]Cl<sub>3</sub>, sendo (A) L = cafeína, (B) L = teofileno, (C) L = metil-1-imidazol, (D) L = benzoimidazol e (E) *cis*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L(NO)]Cl<sub>3</sub>, em que L = nitroso, e secundariamente verificar a toxicidade em células não tumorais e tumorais.

##### 3.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar o potencial dos complexos nitrosilados de rutênio como seqüestradores de radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).
2. Determinar o potencial dos complexos de rutênio como seqüestradores de radical hidroxila (•OH).
3. Determinar a reatividade antioxidante total (TAR) dos complexos nitrosilados de rutênio frente o fluxo de radical peroxila (ROO•).
4. Avaliar a atividade inibitória da lipoperoxidação dos complexos nitrosilados de rutênio, utilizando diferentes modelos de membranas, tais como: microssoma e lipossoma de fosfatidilcolina; induzida por diferentes espécies reativas, entre elas: •OH, Asc<sup>•-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, além de radiação ultravioleta.
5. Avaliar a capacidade antioxidante dos complexos nitrosilados de rutênio frente à oxidação de proteínas induzida por uma fonte química (NaNPS) geradora de radical monóxido de nitrogênio (•NO).
6. Quantificar a nitração da tirosina.
7. Avaliar a toxicidade dos complexos na linhagem de células não tumorais e tumorais leucêmicas de murinos (L1210).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

ABAP (2,2-azo *bis*(2-amidinopropane)), Ácido tiobarbitúrico, Azul de Tripán, Albumina sérica bovina, D-2-deoxiribose, Ferrocianeto de potássio, Folin, Luminol, L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (cód. P-3556), L- $\alpha$ -lecitina (cód. P-5638), Mioglobina, MTT sal de tetrazólio ou brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Nitroprussiato de sódio, NBT sal de tetrazólio ou Nitrobluetetrazólio, Solução tampão de glicina, Sephadex G-25, Tirosina, Trolox, Xantina, Xantina oxidase - Sigma-Aldrich; Ácido L-ascórbico, Ácido tricloroacético – Synth; Ácido clorídrico, Cloreto de cálcio, Cloreto de potássio, Cloreto férrico, Clorofórmio, Ditionito de sódio, Glicerol, Nitrito de sódio, Tartarato de sódio – Nuclear; Ácido nitriloacético, Bicarbonato de sódio, Hidróxido de sódio – Vetec;  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , Peróxido de hidrogênio, Sacarose, Sulfato de cobre, Tampão Tris, – Merck; Sulfato ferroso – Dinâmica; Membrana de policarbonato - poros de tamanho relativo a 400 nm – COSTAR GmbH; Nitrogênio gasoso, Nitrogênio líquido – IBG.

### 4.2 Equipamentos

Agitador tipo Vortex – PHOENIX/AP-56

Balança analítica – SARTORIUS/Basic

Banho-Maria – TECNAL

Bomba de vácuo – TECNAL/TE-058

Centrifuga – EPPENDORF/5410

Centrifuga refrigerada – MPW/350 R

Cintilador – WALLAC

Congelador – CONSUL

Cronômetro – CITIZEN

Espectrofotômetro – PHARMACIA/LKB-Ultospec III

Fluxo laminar – VALICLEAN/CL-II A  
Gabinete de Luz UV – DIST  
Incubadora de CO<sub>2</sub> – ULTRASAFE HF-212 UV  
Leitor de placa Elisa – BIOTEC/EL-800  
Micro-Pipetas - LABMATE  
Microscópio invertido – BIOVAL/XDS-1B  
Refrigerador – BRASTEMP

### **4.3 Metodologia**

#### **4.3.1 Obtenção dos complexos nitrosilados de rutênio**

Os complexos nitrosilados de rutênio foram sintetizados segundo Lopes et al. (2001) e Holanda et al. (2004), sendo cedidos pelo grupo do professor Prof. Dr. Luís Gonzaga de França Lopes, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará (UFC), o qual participa deste trabalho como colaborador.

#### **4.3.2 Formação e monitoramento de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)**

O radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) foi gerado através do sistema de reação entre a xantina e a enzima xantina oxidase (XO). A produção de superóxido foi monitorada espectrofotometricamente ( $\lambda$  = 560 nm) pela redução do “Nitrobluetetrazolium” (NBT). O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 100  $\mu$ M de xantina, tampão fosfato (0,1 M em pH 7,4), 600  $\mu$ M de NBT e 0,07 U/mL de enzima xantina oxidase. O sistema foi incubado a temperatura de 25 °C por um período de 10 minutos na ausência (controle positivo) e presença dos complexos.

Um ensaio controle foi realizado em paralelo para quantificar a atividade enzimática da xantina oxidase, consistindo de um meio de reação com as seguintes concentrações finais: 0,04 U/mL; 0,1 M de tampão fosfato em pH 7,8 e de 100  $\mu$ M de xantina na ausência e presença dos complexos testados. O tempo de incubação para este ensaio foi de 10 minutos em temperatura controlada de 25 °C na ausência (controle positivo) e presença dos complexos nitrosilados de rutênio. A quantificação foi realizada espectrofotometricamente em  $\lambda$  = 295 nm através da formação de ácido úrico derivado da xantina.

Os resultados foram expressos em percentagem, comparando os valores médios das absorbâncias dos ensaios, em triplicata, relativos ao controle com 100% do NBT reduzido; ou então, para o ensaio controle: no qual a densidade ótica (DO) correspondente à máxima produção de ácido úrico relativo ao controle positivo (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988).

#### **4.3.3 Formação e monitoramento de radical hidroxila ( $\cdot$ OH)**

A produção de radical hidroxila foi obtida por uma variação da reação de Fenton, através da mistura de peróxido de hidrogênio com o sistema Fe(III)-NTA, baseando-se na degradação oxidativa da deoxirribose, conforme adaptação do método descrito por Halliwell et al. (1987) e Aruoma et al. (1989). O meio de reação consistiu das seguintes concentrações finais: 10 mM de solução tampão fosfato monobásico em pH 7,4 (ajustado com KOH); 2,8 mM de D-2-deoxirribose; 25  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub>; 100  $\mu$ M de NTA e 1,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Imediatamente, incubou-se o meio reacional à temperatura controlada de 37 °C por um período de tempo de 20 minutos na ausência (controle positivo) e presença das amostras. Ácido nitriloacético (NTA) e cloreto férrico são misturados e incubados por 5 minutos antes da adição ao meio de reação.

A quantificação do radical hidroxila foi realizada através da formação do produto da degradação da deoxirribose, o malondialdeído ou malonildialdeído (MDA). Este reage em meio ácido (solução de ácido tricloroacético 2,8% - TCA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% em solução alcalina (NaOH 0,05 M) formando um produto corado róseo (MDA-TBA). A formação do grupo cromógeno pode ser monitorada espectrofotometricamente em  $\lambda$  = 532 nm. Os resultados foram

expressos em percentagem de deoxirribose oxidada, comparando os valores médios das absorbâncias dos ensaios, em triplicata, relativo a média do controle positivo com 100% de oxidação.

#### **4.3.4 Produção e monitoramento do radical peroxila ( $\text{ROO}^{\bullet}$ )**

A produção *in vitro* dos radicais peroxilas pode ser monitorada através do ensaio de reatividade antioxidante total (*TAR*) adaptado da metodologia descrita por Wayner et al. (1985) e Lissi et al. (1995). O meio reacional, contendo 0,1 M de solução tampão glicina em pH 8,2, 2 mM de ABAP e 6 mM de luminol, foi incubado em temperatura ambiente controlada em 20 °C. Sob estas condições, a decomposição térmica do agente hidrofílico azo-iniciador da reação em cadeia (ABAP) produz radicais peroxilas, provocando uma intensidade de luminosidade emitida pelo luminol quando atacado pelas EROs. A quimioluminescência observada foi quantificada em cintilador (WALLAC 1409).

Os valores de *TAR* foram determinados pela capacidade das amostras de complexos de rutênio em decrescer a velocidade constante de produção de radicais livres, especialmente, radicais peroxilas ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ). A velocidade de produção de radicais livres é proporcional a concentração do iniciador e dependente da temperatura. Os resultados foram expressos de acordo com a razão entre intensidade de luz inicial ( $I_0$ ) na ausência da amostra e a intensidade de luz após a adição da amostra ( $I$ ) em relação à concentração da amostra, fornecendo os valores, em triplicata, relativos à reatividade antioxidante total (*TAR*).

#### **4.3.5 Produção e monitoramento do radical monóxido de nitrogênio ( $^{\bullet}\text{NO}$ )**

O radical monóxido de nitrogênio foi produzido *in situ* pela decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NaNPS). O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 20 mM de tampão fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) em

pH 7,2; 160 mM de NaNPS e 10 mM de mioglobina reduzida. Em seguida, incubou-se a reação por um período de 60 minutos e à temperatura controlada de 37 °C. Durante este tempo, a reação de oxidação transforma a oximioglobina ( $\text{MbO}_2$ ) em metamioglobina (metaMb), produzindo o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Esta reação foi verificada na ausência (controle positivo) e na presença dos complexos adicionados ao meio reacional.

Portanto, a propriedade sequestrante dos complexos nitrosilados de rutênio para com o  $\cdot\text{NO}$  pode ser determinada pela inibição da formação de metamioglobina, sendo esta, monitorada espectrofotometricamente em  $\lambda = 405 \text{ nm}$  (GROSS, 1996).

Os resultados foram expressos em percentagem, comparando os valores médios das absorbâncias dos ensaios em triplicata, relativo à média do controle positivo com 100% de oxidação da mioglobina.

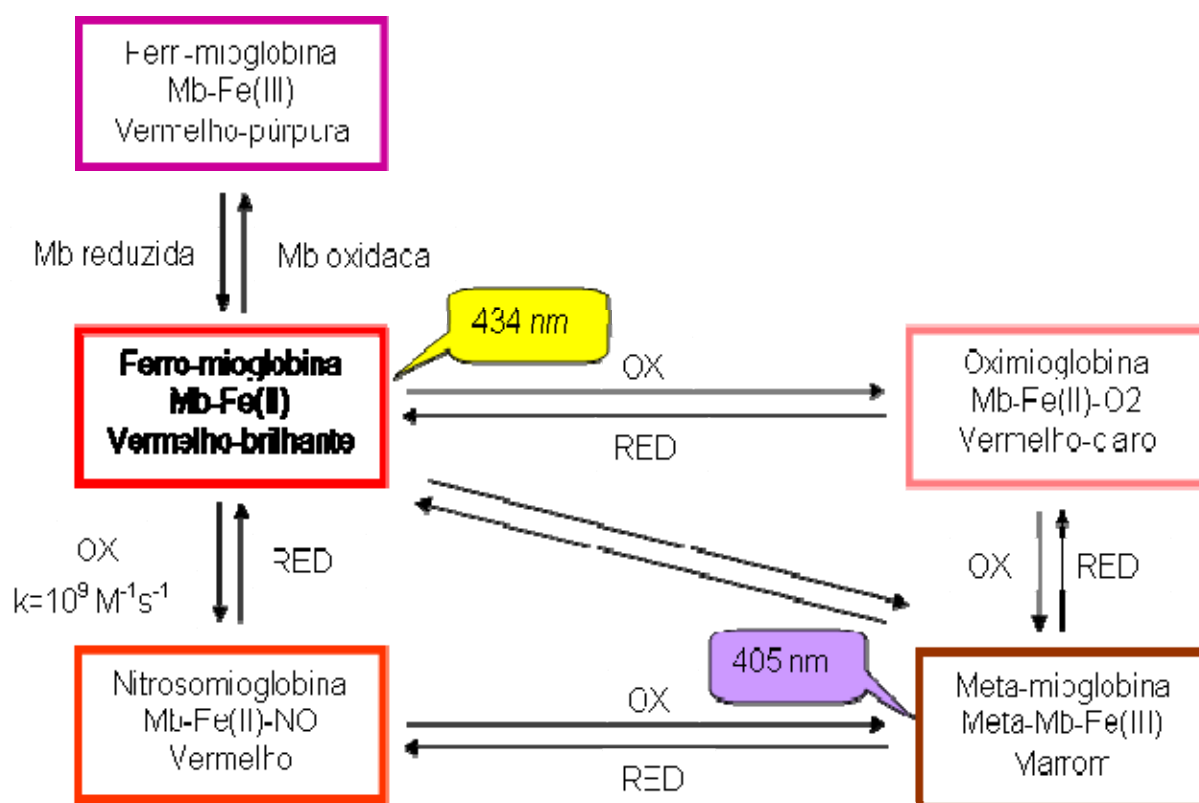
Um ensaio controle foi realizado para avaliar a liberação do ligante nitrosilo a partir dos complexos nitrosilados de rutênio na ausência de NaNPS (gerador de  $\cdot\text{NO}$ ). Estes resultados também foram expressos em percentagem, tomando-se os valores médios das absorbâncias dos ensaios, em triplicata, relativo à média do controle positivo com 100% de mioglobina oxidada.

#### **4.3.5.1 Preparação e concentração da hemeproteína: mioglobina**

A mioglobina foi dissolvida em 12,5 mM de solução tampão tris em pH 7,6 e centrifugada a 2500 g por 5 minutos para remoção de matéria insolúvel. A mioglobina foi reduzida com a pulverização de 0,5-1,0 mg de ditionito de sódio ( $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), em excesso. Para evitar reações secundárias que podem culminar na deterioração da hemeproteína, a mioglobina deve ser logo separada do ditionito.

Para tanto, a mioglobina reoxigenada foi purificada através da eluição em coluna cromatográfica (60 x 8 mm), utilizando o Sephadex G-25 como fase estacionária e solução tampão como fase móvel. A concentração de mioglobina ferrosa foi determinada espectrofotometricamente utilizando o coeficiente de extinção molar de  $\epsilon_{434 \text{ nm}} 1,14 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Para determinação da curva-padrão foram realizadas duas curvas em solução tampão tris 12,5 mM e pH 7,6 com diferentes concentrações de mioglobina reduzida (0,25-1,0 nmol), sendo que, em uma delas a mioglobina foi completamente oxidada pela ação de 120  $\mu$ M de ferrocianeto de potássio. O segmento linear da curva forneceu a concentração de mioglobina correspondente à linearidade do método. Sendo obtido através da variação da densidade ótica (DO) ( $\lambda = 405$  nm) entre a mioglobina reduzida e a mioglobina oxidada representada em um gráfico, em que o eixo Y: corresponde à variação da densidade ótica; e o eixo X: consiste na concentração de mioglobina reduzida utilizada. (GROSS, 1996). A figura 24 apresenta o esquema da transformação da mioglobina em diferentes pigmentos.



**Figura 24.** A densidade ótica (DO) de 434 nm quantifica o íon ferroso do grupamento heme e 405 nm quantifica o íon férrico do grupamento heme (adaptado de GROSS, 1996).

#### **4.3.6 Preparação de microssomas de fígado de rato**

Os microssomas foram obtidos por centrifugação diferencial com agregação de cálcio. Os fígados foram homogeneizados numa concentração de 16,7% em solução tampão tris-sacarose 10/250 mM em pH 7,4 e centrifugados a 600 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada à temperatura de 0-4 °C. Desprezando-se o precipitado. A fração mitocondrial foi obtida centrifugando o sobrenadante a 12000 g por 10 minutos. Desprezando-se o precipitado.

A fração microssomal resultou da obtenção do sobrenadante da precipitação obtida anteriormente, mais a adição de  $\text{CaCl}_2$  80 mM, seguido de adição de solução tampão tris-sacarose 10/250 mM (pH 7,4), agitação vigorosa e centrifugação a 25000 g. Após, desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado com a solução tampão tris-KCl 10/150 mM em pH 7,4 re-suspendendo a fração microssomal e centrifugando a 25000 g por mais 15 minutos. Os microssomas lavados foram ressuspensos em solução tampão de conservação contendo 25 mM de fosfato monobásico em pH 7,4 e 20% de glicerol (SCHENKMAN; CINTI, 1978). Uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração de proteína. O restante da amostra foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido para posterior determinação da atividade antioxidante dos complexos de rutênio nos ensaios de lipoperoxidação.

##### **4.3.6.1 Determinação da concentração de proteína**

A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). A amostra de microssomas foi diluída na proporção de 1:4 e uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  foi adicionada a 750  $\mu\text{L}$  de uma solução extemporânea alcalina ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%; NaOH 0,4%; tartarato de sódio 0,02% e  $\text{CuSO}_4$  0,01%), completando com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada até a obtenção do volume final de 1000  $\mu\text{L}$ . Após o período de incubação de 10 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin diluído na proporção de 1:2, e o sistema foi incubado por mais 30 minutos em temperatura ambiente.

A leitura foi realizada em  $\lambda = 750 \text{ nm}$  e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando a albumina sérica bovina (do inglês: *BSA*).

#### **4.3.7 Ensaio de lipoperoxidação e o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*)**

A concentração de substâncias que reagiram com o ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) foi realizada espectrofotometricamente considerando-se o  $\lambda = 532 \text{ nm}$  e o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , em relação à média dos valores de absorbância em triplicata de três experimentos.

Os resultados das amostras foram expressos em porcentagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, comparando os valores médios das absorbâncias dos ensaios realizados em triplicata, ao valor da média do controle positivo, considerando-o como 100 % de lipoperoxidação (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979).

##### **4.3.7.1 Peroxidação lipídica em microssomas de fígado de rato induzida pelo radical ascorbila ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ )**

A peroxidação lipídica em microssomas isolados de fígado de rato foi induzida pelo sistema ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$ , produtor de radical ascorbila. O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 2 mg/mL de proteína microssomal; 0,1 M de tampão tris-HCl em pH 7,4; 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  e 500  $\mu\text{M}$  de ascorbato (SANZ et al., 1994). As amostras foram incubadas a 37 °C por um período de 20 minutos na presença e ausência (controle positivo) das amostras.

A lipoperoxidação foi determinada pelo método de *TBARS* (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Os resultados foram normalizados para o conteúdo de proteína presente nos microssomas.



#### **4.3.7.2 Peroxidação lipídica em microssomas de fígado de rato induzida pelo radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ )**

A peroxidação lipídica em MC isolados de fígado de rato foi induzida pela reação de Fenton, produtor de radical ascorbila, através do sistema ascorbato/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$  adaptado de Halliwell et al. (1987). O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 2 mg/mL de proteína microssomal; 10 mM de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em pH 7,4; 0,02  $\mu\text{M}$  de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ); 2,8 mM de peróxido de hidrogênio e 100  $\mu\text{M}$  de ascorbato (SANZ et al., 1994). As amostras foram incubadas a 37 °C por um período de 30 minutos na presença e ausência (controle positivo) de amostras.

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de *TBARS* (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Os resultados foram normalizados para o conteúdo de proteína presente nos microssomas.

#### **4.3.7.3 Peroxidação lipídica em microssomas (MC) induzida por radiação UV (ultravioleta)**

A proteção contra a peroxidação lipídica em microssomas de fígado de rato foi induzida por radiação UV. O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 2 mg/mL de proteína microssomal e 100 mM de tampão tris-HCl em pH 7,4. Em seguida, na presença e ausência (controle positivo) de amostras, as suspensões foram mantidas em temperatura ambiente e expostas por um período de 60 minutos à radiação UV, a partir de uma lâmpada (254 nm) colocada a uma distância de 10 cm das amostras.

Um controle para a determinação da oxidação basal foi mantido nas mesmas condições dos demais ensaios, exceto pela não exposição à irradiação, permanecendo, sob temperatura e luminosidade ambiente.

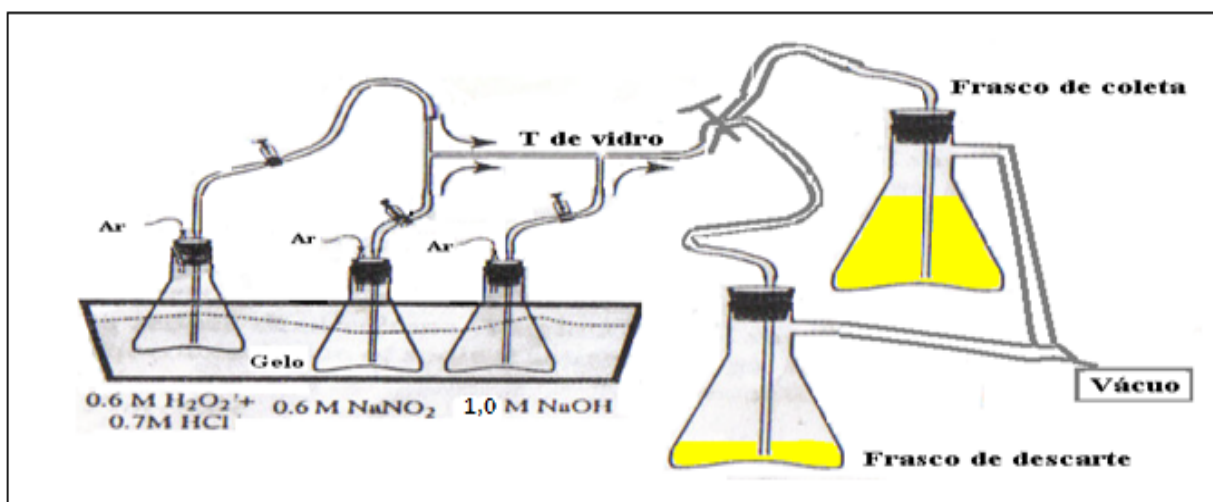
A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de *TBARS* (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Os resultados foram normalizados para o conteúdo de proteína presente nos microssomas.

#### 4.3.7.4 Síntese de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

O peroxinitrito foi sintetizado a partir da mistura de nitrito e peróxido de hidrogênio acidificado pelo método de *Quenched-Flow* descrito por KOPPENOL et al. (1996). Uma bomba de vácuo foi utilizada para gerar o fluxo dos reagentes no sistema, através de uma junção em “T”, na qual mistura uma solução 0,6 M de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) com igual volume de uma solução ácida de 0,6 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 0,7 M de  $\text{HCl}$ . Utilizando outra junção em “T” no sistema, adicionou-se uma solução de  $\text{NaOH}$  1,0 M, conferindo estabilidade ao produto formado:  $\text{ONOO}^-$ .

As soluções devem ser preparadas pouco antes do ensaio, em água deionizada refrigerada em temperatura de 4 °C. Todo o sistema deve ser submetido em banho de gelo durante todo o experimento, inclusive o peroxinitrito. O produto adquire tonalidade amarelada.

A concentração final do peroxinitrito variou entre 160-185 mM, sendo determinada pela absorbância  $\lambda = 302 \text{ nm}$  em  $\text{NaOH}$  0,33 N, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . O produto foi congelado em -80 °C por um período de 2 semanas.



**Figura 25.** Síntese de peroxinitrito: método de *Quenched-Flow* (adaptado de KOPPENOL et al., 1996; DE LIMA, 2005).

#### **4.3.7.4.1 Peroxidação lipídica em microsossomas de fígado de rato induzida pelo ONOO<sup>-</sup>**

A peroxidação lipídica em microsossomas isolados de fígado de rato foi induzida pelo ONOO<sup>-</sup>. O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 2 mg/mL de proteína microsossomal; 0,1 M de tampão tris-HCl em pH 7,4 e 2,68 mM de ONOO<sup>-</sup> (DE LIMA et al., 2004). As amostras foram incubadas a 37 °C por um período de 30 minutos na presença e ausência (controle positivo) das amostras.

A lipoperoxidação foi determinada pelo método de *TBARS* (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Os resultados foram normalizados para o conteúdo de proteína presente nos microsossomas.

#### **4.3.7.5 Preparação de lipossomas (vesículas multilamelares – *MLVs*)**

Vesículas multilamelares foram obtidas por solubilização de lipídio em solvente orgânico apolar – clorofórmio – seguido de evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio gasoso, até obtenção de filme lipídico. Para completa evaporação dos resíduos de solvente o filme foi mantido em vácuo por 1 hora. Após este período, seguiu-se a hidratação dos lipídios com solução tampão em pH 7,4 em concentração e tipo apropriados ao ensaio de lipoperoxidação e suas espécies indutoras de oxidação.

A suspensão foi misturada em agitador do tipo Vortex até completa homogeneidade para a obtenção das *MLVs* (LICHTENBERG; BARENHOLZ, 1988; CASTELLI et al., 1997).

##### **4.3.7.5.1 Preparação de lipossomas (vesículas grandes unilamelares – *LUVs*)**

As vesículas grandes unilamelares (*LUVs*) foram preparadas a partir da suspensão lipossomal de *MLVs* e dispersas em sistema de extrusão através da

membrana de policarbonato contendo poros de tamanho relativo de 400 nm (LICHTENBERG; BARENHOLZ, 1988; CASTELLI et al., 1997)

#### **4.3.7.5.2 Peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina de soja induzida por radical ascorbila ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ )**

A peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina de soja (FCSj) foi induzida pelo sistema ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$ , produtor de radical ascorbila ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ). O meio de reação consistiu das seguintes concentrações finais: 12,5 mg/mL de lipossomas; 0,1 M de tampão tris-HCl em pH 7,4; 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  e 500  $\mu\text{M}$  de ascorbato (SANZ et al., 1994).

As amostras foram incubadas a 37 °C por um período de 20 minutos na presença e ausência (controle positivo) dos complexos. A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de *TBARS* (OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984).

#### **4.3.7.5.3 Peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina de soja induzida por radiação UV (ultravioleta)**

A proteção contra a peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina de soja foi induzida por radiação UV. O meio reacional consistiu das seguintes concentrações finais: 12,5 mg/mL de lipossoma e 100 mM de tampão tris-HCl em pH 7,4. Em seguida, na presença e ausência do complexos (controle positivo), as suspensões foram mantidas em temperatura ambiente e expostas por um período de 60 minutos à radiação UV. A fonte de radiação consistiu de uma lâmpada ( $\lambda = 254$  nm) colocada a 10 cm de altura das amostras.

Um controle para a determinação da oxidação basal foi mantido nas mesmas condições dos demais ensaios, exceto pela não exposição à irradiação. A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de *TBARS* (OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984).

#### **4.3.8 Nitração da tirosina por espécies reativas de nitrogênio (ERNs)**

O método baseou-se na reação entre a solução de 2,5 mM de peroxinitrito e uma solução de 0,5 mM do aminoácido tirosina (solubilizado em gotas de ácido fosfórico 5% em pH 3) em solução 0,1 M de tampão fosfato em pH 7,4.

O produto estável da reação: a 3-nitrotirosina (3-NT) foi quantificada utilizando o pico característico no espectro de absorção de soluções alcalinas. O pKa do grupo fenólico presente na 3-NT é de 7,5, considerado relativamente mais baixo que o da tirosina (pKa em torno de 10,0). Estas duas substâncias possuem pico de absorbância em  $\lambda = 280$  nm. Porém, em pH 3,5 a 3-NT tem um segundo pico situado em  $\lambda = 365$  nm. A 3-NT também apresenta este segundo pico em soluções alcalinas (pH em torno de 9,5) e  $\lambda = 430$  nm. Desta forma, a concentração de 3-nitrotirosina foi calculada monitorando-se a formação desta, espectrofotometricamente em  $\lambda = 430$  nm, na presença ou ausência dos complexos de rutênio, em meio básico tamponado pela solução de glicina 20 mM em pH 10 (HERCE-PAGLIAI et al., 1998; DEIANA et al., 1999).

#### **4.3.9 Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular dos complexos foi avaliada espectrofotometricamente em fatias de fígado de rato, utilizando uma placa de 96 poços. O método baseia-se na incubação das fatias por 50 minutos em 37 °C utilizando 0,5 mg/mL de um agente cromógeno, o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazam púrpura insolúvel, após a clivagem do anel de tetrazólio, por desidrogenases mitocondriais, permitindo a determinação da viabilidade celular através da atividade mitocondrial.

O formazam púrpura foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e determinado espectrofotometricamente em  $\lambda = 550$  nm, sendo proporcional à máxima viabilidade celular relativa à média dos valores de absorbância em triplicata do controle comparado aos complexos (MOSMANN, 1983; SZABÓ et al., 1994).

#### **4.3.10 Atividade citotóxica para linhagens celulares tumorais**

A atividade citotóxica dos complexos foi avaliada em cultura da linhagem de células tumorais leucêmicas de murinos (L1210). Ao meio reacional foram adicionados DMEM (10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina e 10 mM HEPES em pH 7,4) os complexos nitrosilados de rutênio, permanecendo incubado por 24 horas à temperatura de 37 °C em atmosfera umidificada de 5% de dióxido de carbono.

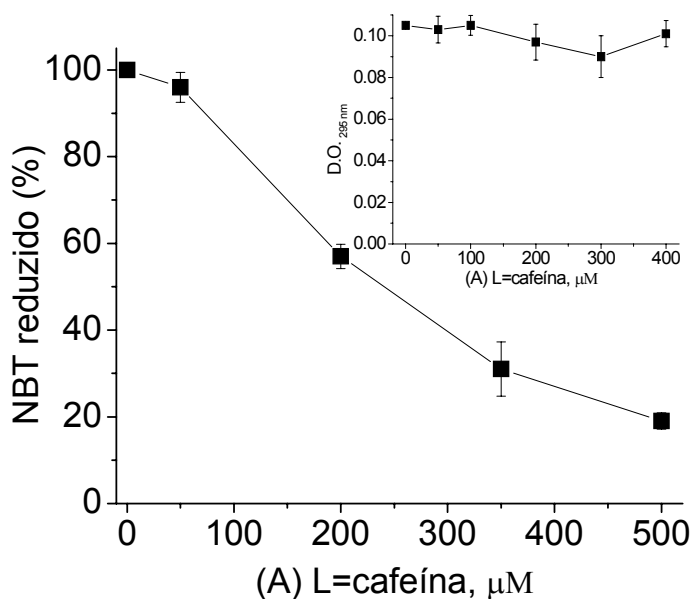
O corante Azul de Tripan 0,5% foi utilizado como método de exclusão. A avaliação da toxicidade celular deu-se pelo método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura insolúvel, após a clivagem do anel de tetrazólio, por desidrogenases mitocondriais.

O formazam púrpura foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e determinado espectrofotometricamente em  $\lambda = 550$  nm, sendo proporcional à ausência de citotoxicidade relativa à média dos valores de absorbância em triplicata do controle comparado aos complexos. O controle consistiu de células incubadas nas mesmas condições, porém na ausência dos complexos (MOSMANN, 1983; SZABÓ et al., 1994).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$

Os ensaios relativos à geração e produção do radical ânion superóxido foram representativos para um dos *trans*-complexos nitrosilados. O valor da concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) relativo à redução de NBT obtido para o complexo (A) foi de  $237 \pm 4,8 \mu M$  (gráfico 1). Ensaios controles para a verificação da atividade enzimática e conseqüente produção de radical foram avaliados mediante a formação de ácido úrico.



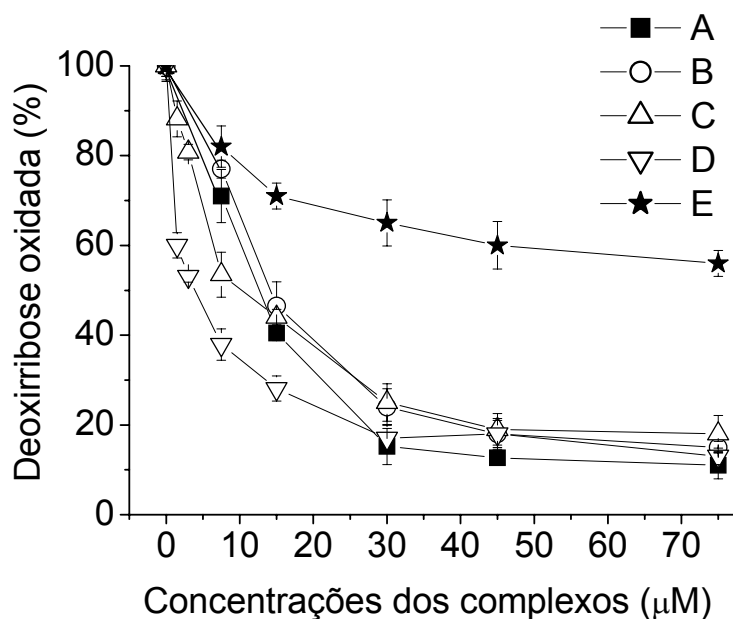
**Gráfico 1.** Efeito do complexo (A) como sequestrador do  $O_2^{\bullet-}$ . Os resultados foram expressos em porcentagem, considerando a máxima formação de  $O_2^{\bullet-}$ , através da redução de NBT, comparados ao controle (100% de redução do NBT). Gráfico interno: controle enzimático da produção de ácido úrico em relação às concentrações do complexo (A). Os resultados foram obtidos através dos valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos.

Os demais complexos demonstraram inibir o sistema xantina/xantina oxidase, apresentando uma ação antioxidante indireta, ou não apresentaram atividade sequestradora para radical ânion superóxido nas concentrações testadas (faixa de 50-400  $\mu\text{M}$ ). O complexo nitrosilado de rutênio (A) não apresentou qualquer inibição enzimática da XO nas concentrações testadas de 50-400  $\mu\text{M}$  (gráfico 1). Apesar de ser um fraco oxidante, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode ocasionar sérios danos em biomoléculas, quando associado com outras espécies radicalares, atuando como redutor em reações contendo metais de transição, geralmente ferro e cobre, e também na produção de um forte oxidante denominado de peroxinitrito, a partir da reação com o  $\bullet\text{NO}$ .

## 5.2 Atividade sequestradora de $\bullet\text{OH}$

Os *trans*-Ru-NO demonstraram uma habilidade em atuar como seqüestradores de radical hidroxila e/ou na proteção da oxidação da deoxirribose (gráfico 2). A velocidade com que o radical hidroxila reage é muito elevada ( $k = 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), portanto, qualquer biomolécula pode vir a ser alterada (HALLIWELL, 1995). Deste modo, as velocidades das reações do radical hidroxila para com os complexos nitrosilados de rutênio ser iam de mesma grandeza, senão maiores. De fato, esses complexos fornecem a capacidade protetora para os *trans*-complexos (D); (C); (A); e (B), alcançando os respectivos valores de  $\text{IC}_{50}$ :  $3,8 \pm 1,4$ ;  $10,3 \pm 4,0$ ;  $12,8 \pm 2,0$ ; e  $14,2 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . O *cis*-complexo (E) não apresentou valores de  $\text{IC}_{50}$  nas concentrações testadas de 7,5 - 75  $\mu\text{M}$ .





**Gráfico 2.** Efeito sequestrador dos complexos nitrosilados de rutênio sob o fluxo de  $\cdot\text{OH}$  produzidos através da reação de Fenton. Os resultados foram expressos em porcentagem, através da máxima formação de  $\cdot\text{OH}$  (100% de deoxirribose oxidada) em relação ao controle, considerando os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos.

**Tabela 10.** Valores de  $E^0$  (*versus* NHE) e valores de  $\text{IC}_{50}$  dos complexos para o sequestro do radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ).

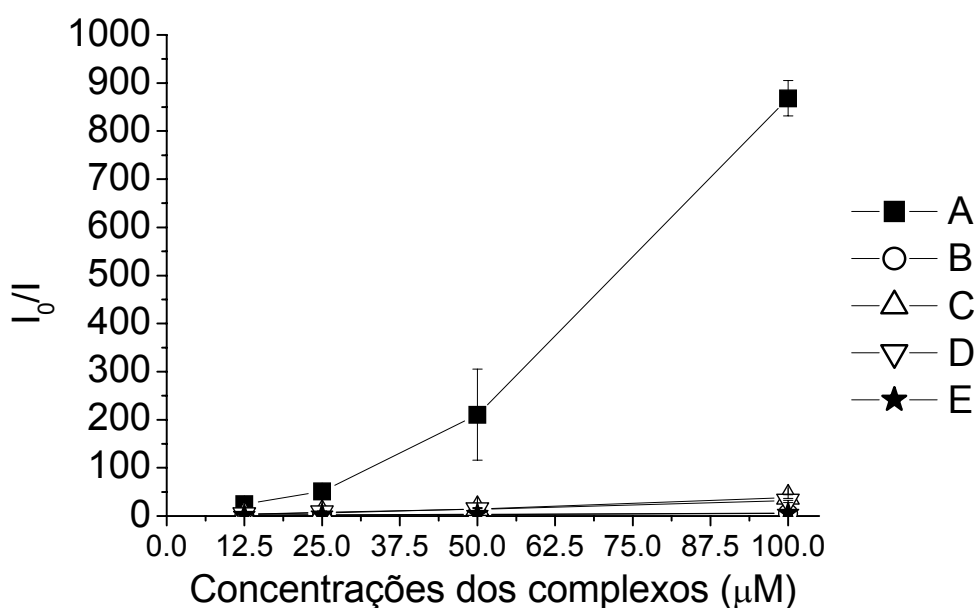
Complexo	$E^0$ ( $\text{RuNO}^+/\text{RuNO}^0$ )(V)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Referência
(B)	- 0,1	14,18	LOPES et al., 2001.
(A)	- 0,12	12,75	LOPES et al., 2001.
(D)	- 0,24	3,81	HOLANDA et al. 2004.

De acordo com Lopes et al. (2001) e Holanda et al. (2004), uma interessante correlação ocorre entre os valores de  $\text{IC}_{50}$  e o potencial padrão redox ( $E^0$ ) para o  $\text{RuNO}^+/\text{RuNO}^0$ . Observou-se que o complexo (D) apresenta o menor valor de  $\text{IC}_{50}$  para o sequestro do  $\cdot\text{OH}$  e também o menor valor do potencial de redução. Isto pode ser explicado pelo alto poder redutor do complexo (D).

### 5.3 Atividade sequestradora de ROO<sup>•</sup>

O ensaio de reatividade antioxidante total (*TAR*) foi utilizado para medir a qualidade da amostra testada em reagir rapidamente com radicais peroxilas gerados pelo azo-iniciador, ABAP, pois os ROO<sup>•</sup> são importantes agentes que mediam a lipoperoxidação de membranas biológicas (DESMARCHELIER et al., 1998).

Um único *trans*-complexo apresentou melhor atividade em relação às demais amostras testadas. Os índices de *TAR* foram obtidos através do inicial decréscimo da intensidade de luminescência. Para tanto, a adição de baixas concentrações (12,5-100 µM) do complexo (A) resultou no instantâneo decréscimo da luminescência, produzindo o melhor resultado quando comparado ao perfil antioxidante dos demais complexos (gráfico 3).



**Gráfico 3.** Efeitos dos complexos nitrosilados de rutênio no ensaio de *TAR*. A instantânea redução de intensidade de quimioluminescência inicial ( $I_0$ ) em relação à intensidade da quimioluminescência ( $I$ ) medida após da adição de amostra nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µM. Os resultados são obtidos através dos valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de dois experimentos.

#### 5.4 Atividade sequestradora de $\bullet\text{NO}$

Em relação à produção e o monitoramento do radical monóxido de nitrogênio, utilizou-se o nitroprussiato de sódio como fonte geradora de  $\bullet\text{NO}$ , e o monitoramento feito através da capacidade deste radical em reagir com as hemeproteínas. Apesar de ser um fraco agente redutor, possui uma ampla atividade biológica, participando de complexos processos fisiopatológicos, principalmente acerca do sistema vascular, na neuromodulação e resposta imunológica (GROSS, 1996; HERENCIA et al., 2001).

Alguns autores já evidenciaram a atividade sequestradora do  $\bullet\text{NO}$  e a inibição enzimática da NOS em cultura de macrófagos de outra série de complexos de rutênio contendo ligantes orgânicos derivados do ácido nicotínico. No mesmo sentido, a atividade antinociceptiva foi demonstrada, provavelmente pela inibição enzimática da NOS (FRICKER et al., 1997; SEIFRIZ et al., 1999; BEIRITH et al., 1999; CRECZYNSKI-PASA et al. 2001).

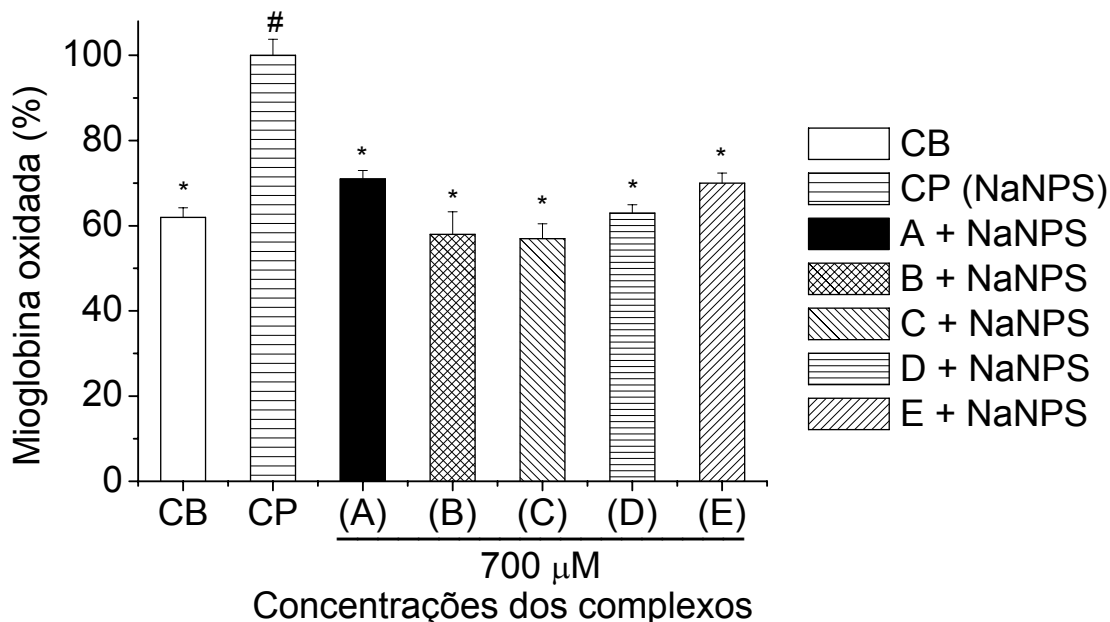
Os complexos aqui testados, especialmente aqueles apresentando a conformação *trans* e os ligantes (B) L = teofilina (C) L = metil-1-imidazol e o (D) L = benzoimidazol demonstraram atividade sequestradora de  $\bullet\text{NO}$  liberado a partir de uma solução de NaNPS.

Geralmente, os ensaios relacionam a liberação do ligante nitrosilo dos complexos de rutênio a partir da ativação da guanilato ciclase em cultura de células musculares lisas e em órgão isolados (LUNARDI et al. 2006; MADHANI et al., 2006; BONAVENTURA et al., 2007; DA SILVA et al., 2007; LUNARDI et al., 2007; ZANICHELLI et al., 2007; LUNARDI et al., 2009). Contudo, pelo método da oxidação de mioglobina pelo radical monóxido de nitrogênio torna-se um tanto vantajoso em razão do baixo custo, da reprodutibilidade dos resultados e da não utilização de cobaias (GROSS, 1996; HALPENNY et al., 2007).

A avaliação da ação dos complexos sobre a mioglobina na ausência do gerador do radical mostra que não há diferença significativa entre os complexos testados e o controle basal (CB). Ou seja, os complexos não são doadores de óxido nítrico para o meio reacional nas condições deste método. Entretanto, os complexos têm a capacidade de liberar o ligante nitrosilo sob redução. Esta redução pode ser

através de estímulo fotoquímico, químico e eletroquímico. De fato, a dissociação de  $\text{NO}^{\bullet}$  é facilitada em complexos que apresentam ligantes *trans*-imidazólicos (CLARKE et al., 1999; LOPES et al., 2001; CLARKE, 2002; TFOUNI et al. (2003). Em muitos casos, a liberação do  $\text{NO}^0$  ocorre após a redução de um elétron do nitrosônio em diferentes velocidades, de modo dependente ao potencial padrão de óxido-redução. Portanto, alguns complexos apresentam valores eletroquímicos acessíveis e viáveis ao meio biológico. Para os complexos (A), (B), (C) e (D), a irradiação fotoinduzida na faixa de  $\lambda=330\text{--}440$  tem a capacidade de produzir o monóxido de nitrogênio derivado do complexo nitrosilado (LOPES et al., 2001; HOLANDA et al., 2004; HOLANDA et al. 2008).

Em relação ao controle positivo (CP), as demais amostras testadas demonstraram diferença significativa (gráfico 4). A reação do controle positivo (CP) foi conduzida somente na presença de Mb e de uma substância geradora de  $\text{NO}^{\bullet}$  (NaNPS).

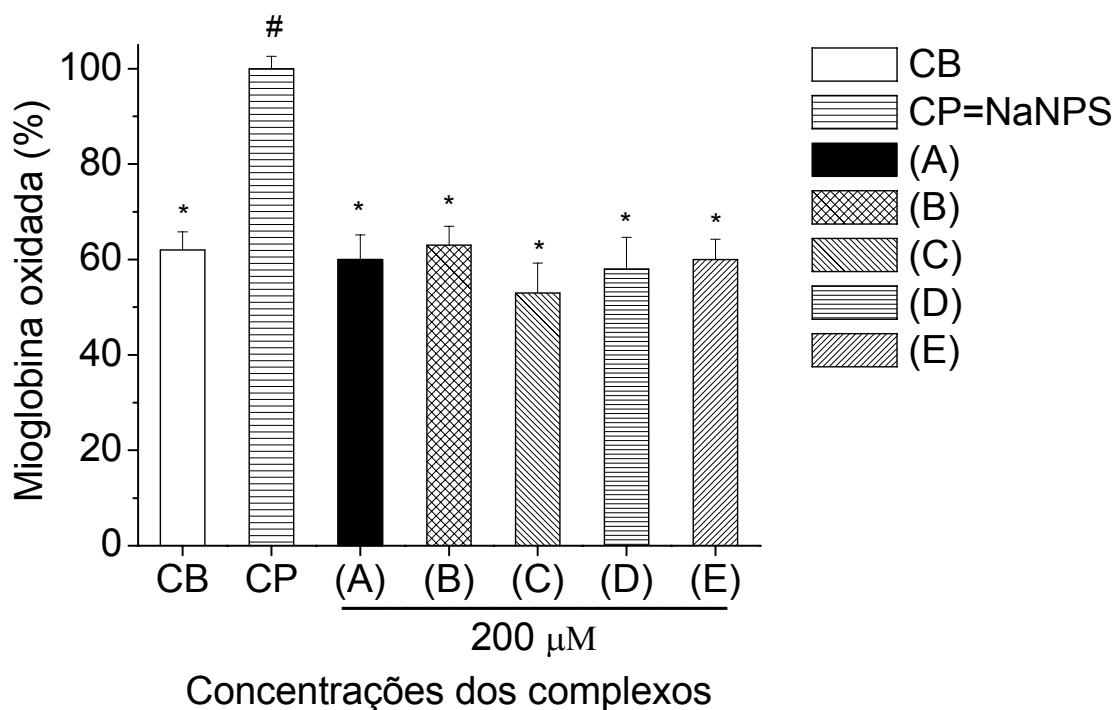


**Gráfico 4.** Efeito dos complexos de rutênio na inibição da oxidação de Mb induzida pelo  $\text{NO}^{\bullet}$ . (\*)  $p < 0,05$  corresponde a uma diferença significativa em relação ao controle positivo (100 % de mioglobina oxidada ou de metamioglobina) e (#)  $p < 0,05$  uma diferença significativa em relação ao controle basal. Controle positivo (CP) = 100% de oxidação da mioglobina. Controle basal (CB) = oxidação basal da Mb.

Concentração de NaNPS: 160 mM. Análise estatística: ANOVA, seguida pelo teste “t” de Bonferroni.

### 5.5 Atividade dos complexos nitrosilados de rutênio na liberação de $\cdot\text{NO}$

Além do ensaio relacionado à produção de  $\cdot\text{NO}$  a partir de uma fonte geradora de ERNs e do potencial de sequestrador, os complexos nitrosilados de rutênio também foram submetidos a um ensaio controle, relacionando a capacidade de liberação dos ligantes nitrosilos da estrutura organometálica. Para isto, procedeu-se os ensaios nas mesmas condições do ensaio anterior, exceto pela não adição ao meio reacional do agente NaNPS. Este foi adicionado somente no controle positivo na concentração de 160 mM, suficiente para que ocorra a perda do estado reduzido da mioglobina.



**Gráfico 5.** Efeito dos complexos nitrosilados de rutênio na doação de  $\cdot\text{NO}$ . (\*)  $p < 0,05$  corresponde à diferença significativa em relação ao controle positivo (presença de NaNPS) e (#)  $p < 0,05$  uma diferença significativa em relação ao controle basal.

Controle basal (CB). Concentração de NaNPS: 160 mM. Análise estatística: ANOVA, seguida pelo teste “t” de Bonferroni.

Os resultados mostraram que nenhum dos cinco complexos testados na concentração de 200  $\mu$ M foram capazes de oxidar a mioglobina em mais de 62% (oxidação basal da Mb), permanecendo esta no estado reduzido, em aproximadamente 38%. Nenhuma diferença significativa ocorreu entre o controle basal e os complexos testados. Mas, ocorreu diferença significativa entre o controle positivo (presença de NaNPS) e os complexos testados.

## 5.6 A lipoperoxidação induzida por $\cdot$ OH

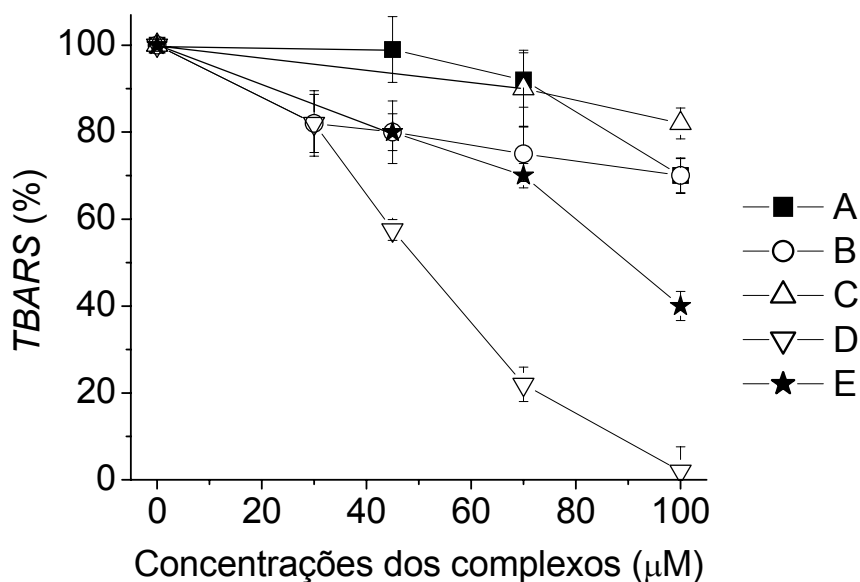
Como já mencionado anteriormente, o  $\cdot$ OH é entre as espécies radicalares, a mais deletéria e capaz de oxidar muitas biomoléculas de maneira randômica e com alta velocidade de reação. Entre as biomoléculas, os AGPIs das membranas plasmáticas de células e de organelas são o principal alvo para estas espécies, portanto, o processo de lipoperoxidação pode iniciar-se e depender do estímulo. A LPO também tem implicação fisiológica no que diz respeito à produção de prostaglandinas através da atividade enzimática das COXs e na detoxificação de organismos submetidos à poluição ambiental e ao uso de drogas (reações de fase 1 – hidroxilação/monoxigenase; e fase 2 – reações de conjugação) (CASALINO et al., 1996; CASTELLI et al., 1997; STANBRO, 2005a; STANBRO, 2005b; STANBRO, 2005c; DE LIMA et al., 2004; MCKAY et al., 1993).

A produção de  $\cdot$ OH através da reação de Fenton tem sido freqüentemente relacionada, contudo, o envolvimento de distintas espécies reativas e radicalares envolvidas no processo de LPO têm sido discutidos. SOD e catalase são capazes de inibir a LPO significativamente (ARUOMA et al., 1989). Da mesma forma, os íons de ferro são responsáveis pela etapa de iniciação na LPO enzimática e não enzimática (CASALINO et al., 1996; CASTELLI et al., 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; DE LIMA et al., 2004).

Neste sentido, avaliamos a capacidade dos complexos nitrosilados de rutênio de proteger a peroxidação lipídica em diferentes modelos de membrana induzida por diferentes espécies radicalares.

### 5.6.1 Proteção da lipoperoxidação em microssomas induzida por $\cdot\text{OH}$

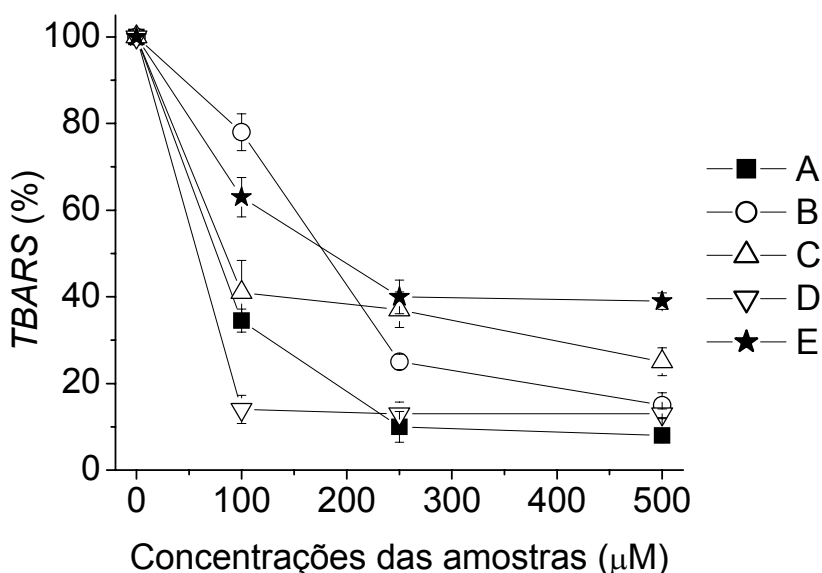
Efeitos protetores de membranas fosfolipídicas contra a oxidação induzida pelo sistema ascorbato/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+3}$  (gerador de  $\cdot\text{OH}$ ), utilizando o modelo de membrana microssomal foram observados para os complexos (D) e (E), apresentando valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $50,8 \pm 4,5$  e  $88,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$ , respectivamente. Os demais complexos não alcançaram os valores de  $\text{IC}_{50}$  nas concentrações testadas de 50-100  $\mu\text{M}$ .



**Gráfico 6.** Efeito dos complexos como inibidores da lipoperoxidação induzida pelo  $\cdot\text{OH}$  (Reação de Fenton) em MC de fígado de rato. Resultados expressos em porcentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados, através da máxima formação de TBARS obtida em relação ao controle positivo.

### 5.6.2 Proteção da lipoperoxidação em microssomas e lipossomas induzida por $\text{Asc}^{\bullet-}$

Segundo Hubel et al. (1997), o  $\text{Asc}^{\bullet-}$  é uma espécie química capaz de iniciar o processo de peroxidação lipídica. Durante a atividade antioxidante do ascorbato, uma espécie radicalar intermediária é formada através de duas consecutivas reações, cada uma envolvendo a oxidação de um elétron, até a obtenção de ácido dehidroascórbico (ADH).



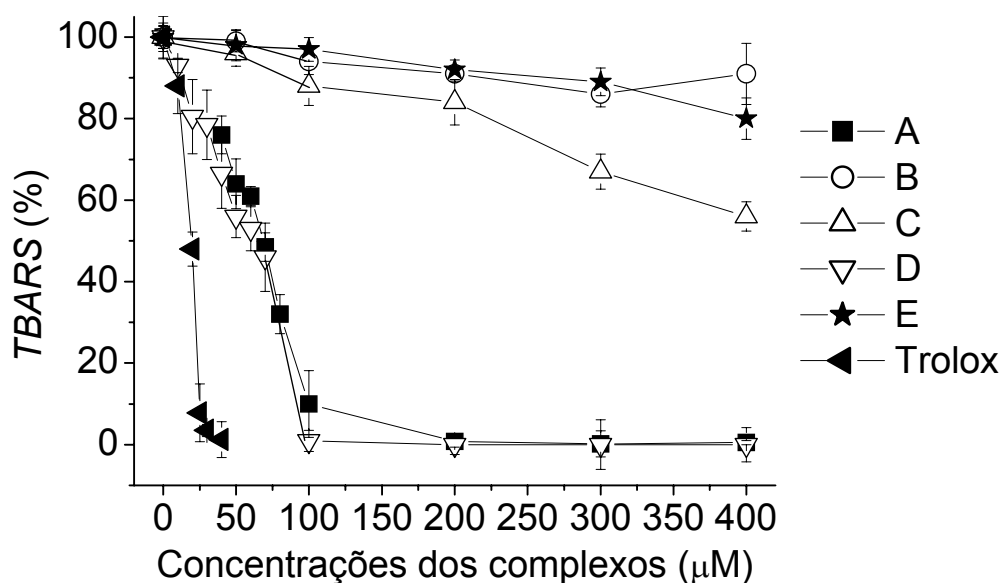
**Gráfico 7.** Efeito protetor dos complexos nitrosilados de rutênio na LPO em lipossomas de fosfatidilcolina de soja, induzida por  $\text{Asc}^{\bullet-}$ . Resultados expressos em porcentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados, através da máxima formação de TBARS obtida em relação ao controle positivo.

Todos os complexos nitrosilados de rutênio testados apresentaram inibição da lipoperoxidação de modo dependente da concentração, quando induzida por  $\text{Asc}^{\bullet-}$ , em lipossomas de fosfatidilcolina de soja. Os complexos de conformação *trans* (D),



(A) e (C) apresentaram os respectivos valores de  $IC_{50}$ :  $58,8 \pm 1,9$ ;  $75,3 \pm 2,9$ ;  $84,1 \pm 2,4 \mu M$ ; em relação aos demais complexos testados os valores de  $IC_{50}$  alcançaram a concentração próxima de  $180 \mu M$ .

Uma similaridade na atividade antioxidante transcorre no ensaio utilizando outro modelo de membrana que não os lipossomas, e sim, os microssomas. Os microssomas caracterizam-se por apresentarem membranas mais heterogêneas em relação à sua constituição. Neste aspecto, o perfil antioxidante do ensaio relativo à oxidação por  $Asc^{\bullet-}$ , não diferiu daquele relatado para os lipossomas, exceto pela fraca atividade do complexo (C), cujo valor de  $IC_{50}$  não foi alcançado para uma concentração de até  $400 \mu M$ . Para os *trans*-complexos nitrosilados de rutênio (D) e (A) os valores de  $IC_{50}$  foram  $61,93 \pm 5,21$  e  $69,98 \pm 4,83 \mu M$ , respectivamente. O análogo hidrossolúvel da vitamina E denominado de Trolox, foi utilizado neste ensaio como substância de referência para a atividade antioxidante, demonstrando um valor de  $IC_{50} = 19,28 \pm 7,01 \mu M$ .

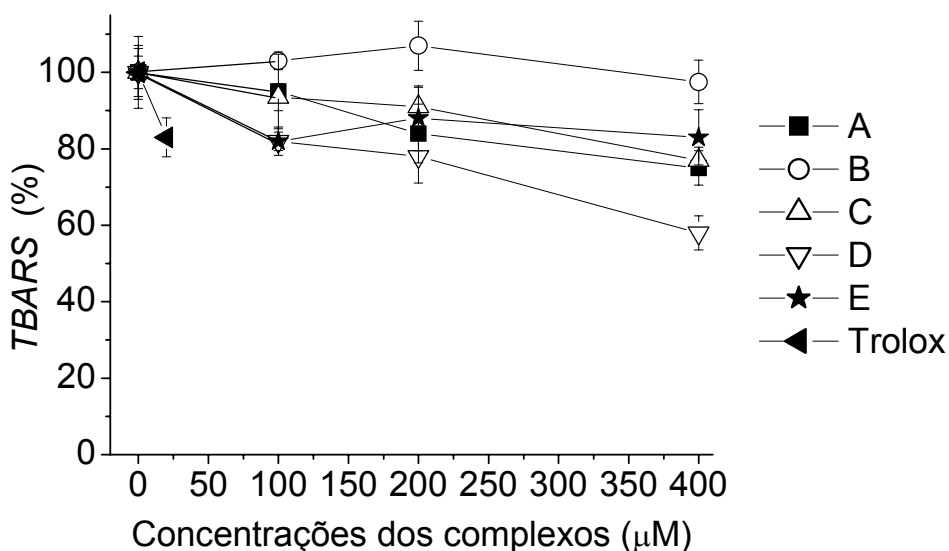


**Gráfico 8.** Efeito das diferentes amostras como inibidores da lipoperoxidação induzida pelos  $Asc^{\bullet-}$  em microssomas (MC) de fígado de rato. Resultados expressos em porcentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados, através da máxima formação de *TBARS* obtida em relação ao controle positivo.

### 5.6.3 Proteção da lipoperoxidação em microssomas e em lipossomas induzida por radiação UV

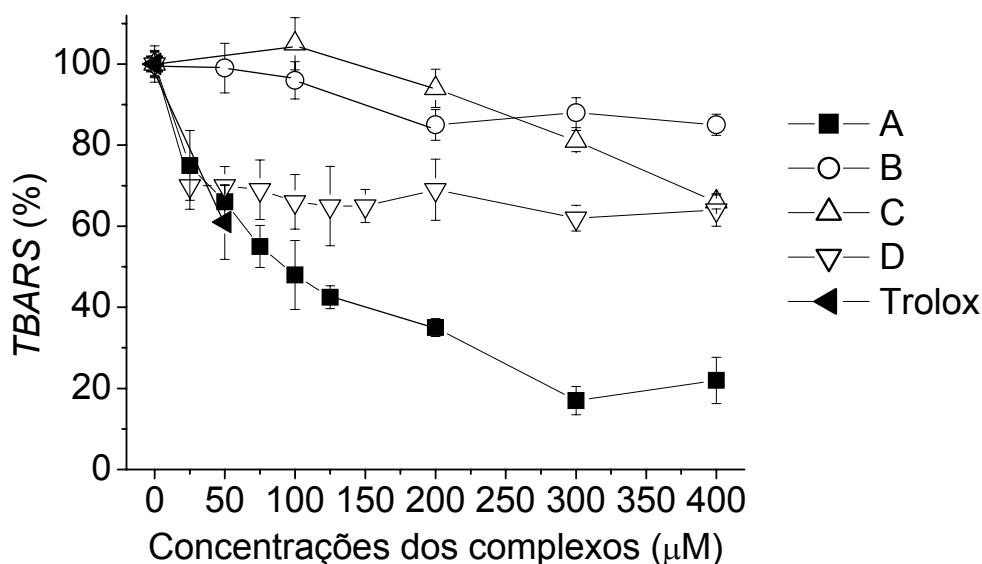
De fato, a progressiva exposição à irradiação UV promove a degradação dos AGPIs das membranas. Além disto, as espécies reativas envolvidas neste processo são capazes de provocar efeitos cumulativos em relação ao dano do *DNA* e contribuir etiologicamente para diversas doenças (YAMAGUCHI et al., 2005).

Modelos de membrana como lipossomas de fosfatidilcolina de soja (*MLVs*) foram utilizados para induzir a LPO através da radiação ultravioleta. Os complexos nitrosilados de rutênio não foram capazes de inibir a LPO de forma satisfatória, não alcançando valores de  $IC_{50}$  nas concentrações testadas de 100-400  $\mu M$ . A utilização de Trolox na concentração de 20  $\mu M$  foi capaz de inibir somente 17% da formação de *TBARS*, de modo que seriam necessárias concentrações mais elevadas para que se pudesse alcançar o valor de  $IC_{50}$ .



**Gráfico 9.** Efeito dos diferentes amostras como inibidores da lipoperoxidação induzida por radiação UV em lipossomas de fosfatidilcolina de soja. Resultados expressos em porcentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados através da máxima formação de *TBARS* obtida em relação ao controle positivo.

Apesar da fraca atividade antioxidante contra a radiação UV em lipossomas, a substituição do modelo de membrana para microssomas possibilitou o aumento da potência dos complexos frente a este tipo de oxidação. Entre as amostras testadas que apresentaram melhor atividade antioxidante destaca-se o *trans*-complexo nitrosilado de rutênio (A), cujo valor de  $IC_{50}$  é igual a  $92,61 \pm 7,37 \mu M$ . As demais amostras dos complexos não apresentaram valores de  $IC_{50}$  nas concentrações testadas de 25-400  $\mu M$ . Como substância de referência para os ensaios de LPO, utilizou-se o Trolox nas concentrações de 50  $\mu M$ , inibindo no máximo 40% da formação de *TBARS* (gráfico 10).

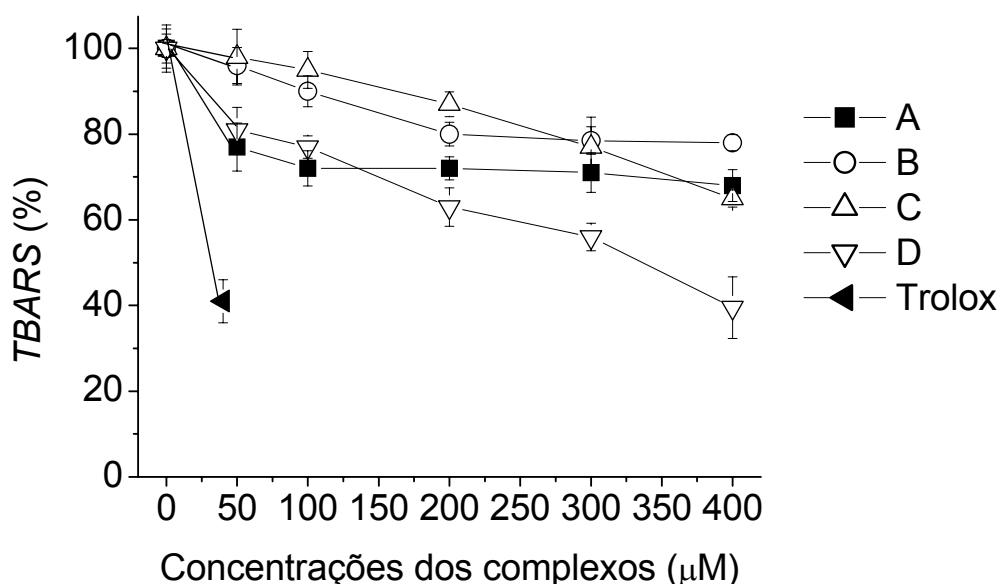


**Gráfico 10.** Efeito protetor dos complexos nitrosilados de rutênio na LPO em MC, induzida por radiação UV. Resultados expressos em porcentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados através da máxima formação de *TBARS* (%) obtida em relação ao controle positivo.

#### 5.6.4 Proteção da lipoperoxidação em microssomas induzida por peroxinitrito

Nos ensaios referentes à lipoperoxidação em MC induzida por  $ONOO^-$ , somente um dos complexos nitrosilados de rutênio demonstrou alcançar o valor de

IC<sub>50</sub> nas concentrações testadas de 50-400  $\mu$ M. O valor de IC<sub>50</sub> exibido para o complexo (D) foi de  $333,4 \pm 6,9 \mu$ M. O antioxidante Trolox foi utilizado como substância de referência ao ensaio devido à sua conhecida capacidade de proteção às membranas, relacionada à interrupção das oxidações em cadeia, localizando-se especialmente na interface externa da membrana. O valor de IC<sub>50</sub> encontrado para o Trolox foi de  $31,25 \pm 5,01 \mu$ M (gráfico 11). O *cis*-complexo (E) não apresentou atividade para este ensaio, exibindo um perfil pró-oxidante em relação aos demais *trans*-complexos. Por este motivo, não está representado no gráfico abaixo.



**Gráfico 11.** Efeito das diferentes amostras como inibidores da LPO em MC induzida pelo  $\text{ONOO}^-$ . Resultados expressos em porcentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados através da máxima formação de TBARS obtida em relação ao controle positivo.

A solubilidade dos complexos favorece a atividade antioxidante em ambiente hidrofílico, através do mecanismo de sequestro, especialmente, para o radical hidroxila. Em ambiente lipofílico, os complexos apresentam maior potencia em relação aos radicais com tempo de meia-vida maior (radical ascorbila). Contudo, devido à baixa solubilidade dos complexos em fase orgânica eles não apresentam um potencial antioxidante elevado em relação à lipoperoxidação de membranas,

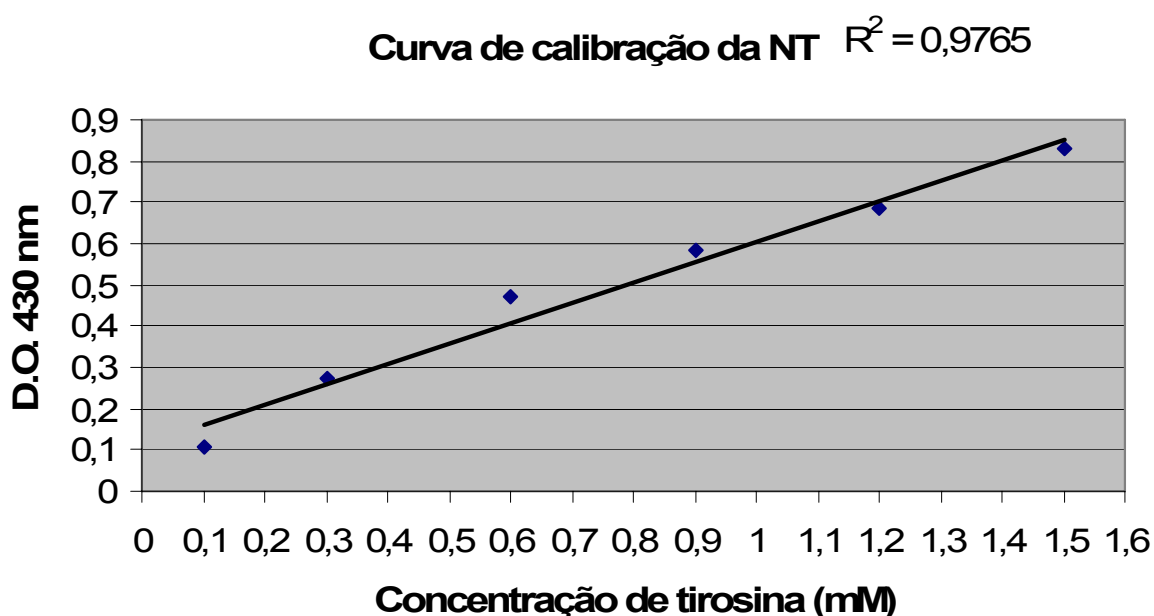
encontrando provavelmente, dificuldades na permeação lamelar. Todavia, as espécies radiculares possuem maior difusibilidade sobre a estrutura de bicamada, provocando maiores índices de LPO.

Além disto, cabe citar que o modelo de membrana microssomal apresenta mais heterogeneidade em relação a sua constituição lipídica e protéica, provocando alterações no comportamento físico da membrana e na propriedade eletrostática do sistema. Outro fator determinante no sistema são as constantes de velocidade de reação com as moléculas-alvos (VASCONCELOS et al., 2007). De fato, Ledbetter e Schaertel (1998) relataram que a influência de cargas nas membranas pode interferir na constante de velocidade entre lipídios, radicais e antioxidantes devido à colisão entre elas.

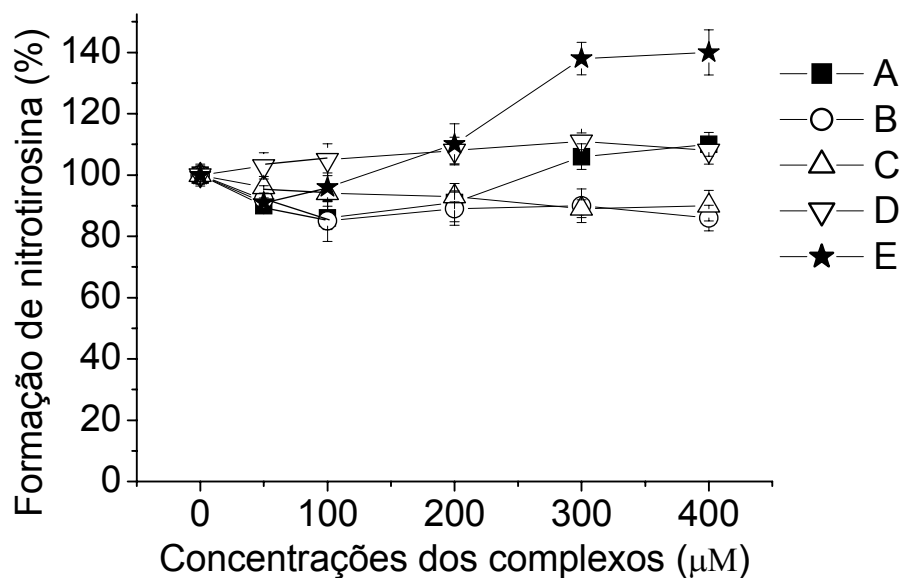
## 5.7 Atividade inibitória da nitração da tirosina

A nitração de proteínas pode modificar a estrutura e alterar a função enzimática, no qual tem sido relacionada às inúmeras doenças do sistema respiratório (exemplo: tabagismo) e vascular, sendo um marcador de processo inflamatório e dano oxidativo *in vivo* secundário à via do óxido nítrico e à geração de ERNs (VAN DER VLIET et al. 1995; BECKMAN, 1996; VAN DER VLIET et al., 1999; HERENCIA et al., 2002; RADI, 2003).

Por causa de sua velocidade de sua formação, próxima ao limite de difusão ( $k = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e da onipresença de seus precursores ( $\text{O}_2^{\bullet -}$  e  $\bullet\text{NO}$ ) podem ocorrer reações diretas e secundárias ao conteúdo de  $\text{ONOO}^-$ . Muitos são os fatores que controlam as reações, entre eles a concentração de precursores, localização nos tecidos e tipo celular, concentração de componentes críticos da célula, incluindo prótons (pH), tióis,  $\text{CO}_2$  e a concentração das defesas enzimáticas antioxidantes. A característica do ambiente define a constante do estado e de concentração do  $\text{ONOO}^-$ , produzindo o ácido peroxinitroso, o  $\bullet\text{NO}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$  e  $\bullet\text{CO}_3^-$  (STANBRO, 2000a; HEROLD, 2004; WOODCOCK; FREEMAN, 2009).



**Gráfico 12.** Curva padrão para a formação de NT a partir da reação entre 2,0 mM de  $\text{ONOO}^-$  e a tirosina. Resultados expressos em densidade ótica (DO) de acordo com os valores da média.



**Gráfico 13.** Efeito dos complexos como inibidores da nitração do aminoácido tirosina induzida pelo  $\text{ONOO}^-$ . Resultados expressos em percentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos diferentes comparados através da máxima formação de NT obtida em relação ao controle positivo.

Estudos adicionais consideram a nitração da tirosina como um produto típico do ciclo redox da célula. Ou seja, fisiologicamente, a nitrotirosina (NT) possui fundamental importância no processo de sinalização celular, capaz de alterar a transdução de sinais relacionados ao receptor da tirosina quinase, afetando a sequência de informações inerentes à família das proteínas quinases ativadoras da mitose - *MAPKs* e à fosfatidilinositol - *PI-3/Akt*, assim como as respostas celulares ao estímulo do estresse (ISCHIROPOULOS, 2002; KLOTZ et al., 2002).

De fato, as proteínas produzidas pós-tradução sofrem modificações, sendo reconhecidas, degradadas proteoliticamente e removidas (ISCHIROPOULOS, 2003; SOUZA et al., 2008). Portanto, o aumento das concentrações de nitrotirosina nos organismos vivos, pode ocorrer não somente pelo aumento da exposição às ERNs, mas também pela perturbação dos mecanismos proteolíticos e de reparação. A existência do mecanismo de reparo para as proteínas nitradas fornece um importante fator na possibilidade de incluir o papel da nitração da tirosina na transdução do sinal, reciclagem de proteínas e no aspecto funcional (ISCHIROPOULOS, 2003; SOUZA et al., 2008).

Embora os complexos nitrosilados de rutênio não tenham alcançado os valores de  $IC_{50}$  nas concentrações testadas de 50-400  $\mu$ M, o método implementado torna-se uma alternativa viável na seleção de substâncias com potencial atividade inibitória da formação de nitrotirosina para trabalhos futuros.

## 5.8 Viabilidade celular

Efeitos tóxicos dos xenobióticos podem ser ocasionados por diferentes mecanismos, culminando no dano celular (MCKAY et al., 1993). Os principais alvos são o *DNA*, *RNA* e proteínas. Caso o xenobiótico atue sobre uma enzima de função celular crítica, como as relacionadas ao processo de respiração celular ou à regulação da permeabilidade da membrana lipídica, a homeostase celular pode ser afetada gravemente, tornando, o dano rapidamente evidente (MCKAY et al., 1993; KEHRER, 1993).

Os ensaios demonstraram a ausência de toxicidade dos complexos nitrosilados de rutênio testados na concentração de 150  $\mu$ M, quando incubados por

1 hora em 37 °C, na presença de fatias de fígado de rato de tamanho aproximado a 400  $\mu\text{m}$  (gráfico 14) trabalhos anteriores já reportaram a menor toxicidade dos complexos contendo rutênio como átomo central, uma vez que suas características se assemelham ao ferro (CLARKE, 2002).

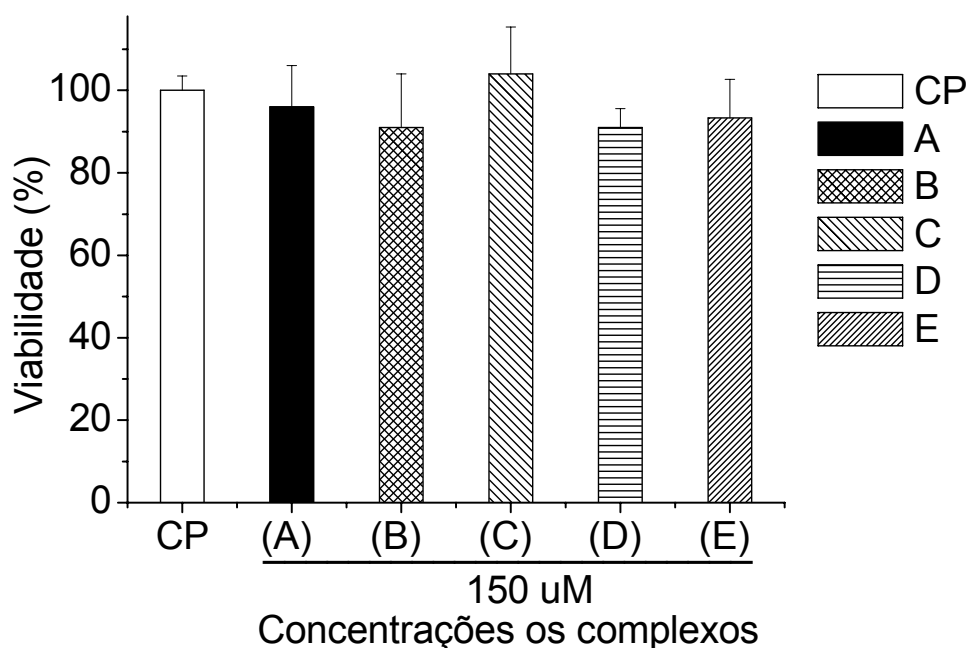


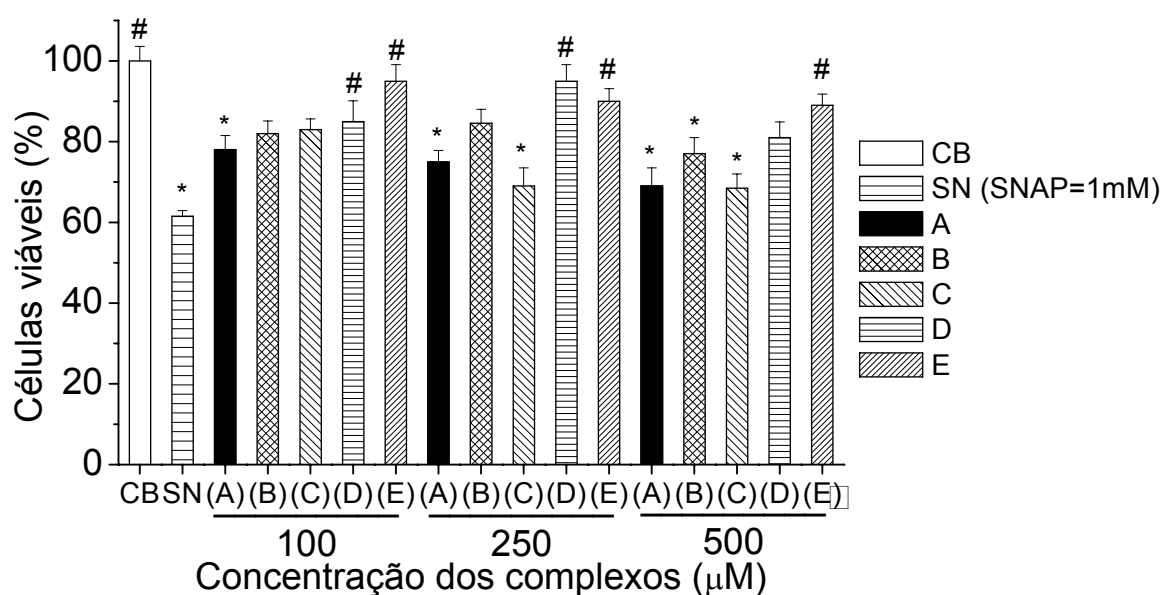
Gráfico 14. Ensaio da viabilidade celular em fatias de fígado de rato, monitorada através do método de MTT. A densidade ótica do controle positivo (CP) foi considerada como 100% de viabilidade. Cada coluna representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. Concentrações das amostras: 150  $\mu\text{M}$ .

Marcondes et al. (2002) demonstraram que complexos do tipo ciclamo-Ru-NO (avaliado pelo método de MTT) não alcançam os valores de  $\text{IC}_{50}$ , quando administrados na concentração de até 3 mM, demonstrando a baixa citotoxicidade para células de fibroblasto pulmonar de Hamster chinês (V-79).



## 5.9 Atividade antitumoral

No estudo de antitumorais os complexos de rutênio tem potencial atividade contra diversos tipos de linhagem celular, apresentando valores de  $IC_{50}$  relativamente baixos. É o caso de uma série de complexos polipiridil de rutênio II investigada perante sua atividade antitumoral em células leucêmicas de camundongo (L1210), carcinoma epidermóide oral humano (KB), câncer hepático (Bel-7002) e células leucêmicas de promielócito humano (HL-60), encontrando o valor de  $IC_{50}$  abaixo de 5  $\mu M$  relativo à cultura celular de células KB (LIU et al., 2007).



**Gráfico 15.** Atividade antitumoral em linhagem de célula L1210, utilizando o método de MTT. CB = controle basal; CP = controle positivo (concentração de SNAP = 1 mM). Cada coluna representa os resultados expressos em percentagem de acordo com os valores da média  $\pm$  desvio padrão, em triplicata, de três experimentos comparados através da máxima DO obtida em relação ao controle basal. (\*)  $p < 0,05$  comparado ao controle basal e #  $p < 0,05$  comparado ao SNAP. Análise estatística: ANOVA, seguido pelo teste “t” de Bonferroni.

A citotoxicidade do SNAP (fonte geradora de  $^*NO$ ) e dos complexos nitrosilados de rutênio foi testada sobre a cultura de células tumorais de leucemia linfoblástica de murinos (L1210). Pelo método de exclusão utilizando a coloração Azul de Tripan,

confirmou-se a viabilidade celular, através da integridade da membrana. No ensaio empregando o método do MTT, a DO do controle basal serviu como parâmetro da viabilidade celular em relação às demais amostras. O controle positivo demonstrou inviabilização das células em aproximadamente 40%, quando testado na concentração de 1 mM.

Uma série de complexos areno de rutênio II demonstrou valores de  $IC_{50}$  inferiores a 3,0  $\mu$ M para células A549 e H520 de pulmão, todavia apresentaram uma potencial atividade citotóxica para a cultura de hepatócitos humanos (GUICHARD et al., 2006).

Bacac et al. (2004) demonstraram citotoxicidade do complexo de rutênio de fórmula  $[H_2im][trans-RuCl_4(DMSO-S)(Him)]$  denominado de NAMI-A através do ensaio de MTT em linhagens celulares de carcinoma ovariano humano (A2780 e A2780rescis) utilizando concentrações de 1 mM, e obtendo valores acerca de 30% na morte celular de ambas.

Amino complexos de rutênio II e Ru III ligam-se seletivamente a sítios imino em biomoléculas. Um número de complexos de rutênio com atividade antitumoral parece penetrar na célula através de um processo mediado pela transferrina e, conseqüentemente, ligar-se ao *DNA* pela ativação por redução (CLARKE, 2002).

## 6 CONCLUSÕES

A prospecção estrutural destes complexos faz-se necessária devido às características intrínsecas de cada ligante, em especial o nitrosilo e sua complexa atividade biológica. Contudo, o amplo espectro relacionado às propriedades antioxidantes dos complexos (A) e (D) satisfazem, inicialmente, os estudos relacionados à “estrutura x atividade biológica” (visualizar tabela 11).

Observou-se a ausência de citotoxicidade dos complexos ao tecido hepático de ratos na concentração de 150  $\mu\text{M}$ . Segundo Tfouni et al. (2003) os complexos da série *trans*-[Ru(NO)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Y](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, em que Y=nic, isn, L-hist, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, imN e P(OEt)<sub>3</sub> demonstraram baixa citotoxicidade em hepatócitos de rato (IC<sub>50</sub> > 3 mM) e células V79 (IC<sub>50</sub> ~ 2 mM).

Os *trans*-complexos nitrosilados de rutênio possuem alta capacidade sequestradora para o radical hidroxila (IC<sub>50</sub> inferiores a 15  $\mu\text{M}$ ). Sendo que em estudos anteriores, Creczynski-Pasa et al. (2001) e Seifriz et al. (1999) já haviam demonstrado o potencial sequestrador dos *trans*-complexos de rutênio com valores de IC<sub>50</sub>= 0,3-10  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Contudo, não se tratavam de complexos de Ru-NO, mas sim, *trans*-complexos, tendo ligantes clorados e derivados do ácido nicotínico.

Obtivemos uma correlação entre os valores eletroquímicos de E<sup>0</sup> (*versus* NHE) e valores de IC<sub>50</sub> dos complexos para o sequestro do radical hidroxila (\*OH), ou seja, quanto menor o potencial de redução, menor o valor de IC<sub>50</sub>.

Todos os cinco complexos nitrosilados de rutênio testados apresentaram atividade sequestradora do \*NO (NaNPS). Fricker et al. (1997) já haviam descrito a atividade sequestradora de \*NO para os complexos poliaminocarboxilatos de rutênio (III), utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. Assim como, Creczynski-Pasa et al. (2001) também o fez, empregando complexos de rutênio clorados e derivados do ácido nicotínico. Logo, apesar da atividade sequestradora do \*NO, Lopes et al. (2001) e Holanda et al. (2004a; 2004b) relataram a liberação do ligante nitrosilo destes complexos (*cis/trans*) através de estímulos eletroquímicos e químicos. Holanda et al. (2008) também demonstrou a liberação do ligante nitrosilo nos *trans*-complexos a partir da fotoindução em  $\lambda=340-440\text{ nm}$ .

Lopes et al. (2001); Bertolini (2004); Holanda et al. (2008) propuseram que a reatividade do ligante nitrosilo depende das características dos ligantes orgânicos na molécula, assim como de suas conformações *cis/trans*, sugerindo a utilização destes complexos como pró-fármaco em uma possível terapia fotodinâmica.

O complexo (A) apresentou um valor de  $IC_{50} = 237 \mu M$  para a atividade sequestradora de  $O_2^{\bullet-}$ . Creczynski-Pasa et al. (2001), obtiveram valores de  $IC_{50}$  entre 6-450  $\mu M$ , utilizando *trans*-complexos de rutênio não nitrosilados.

Os resultados demonstram um perfil variado em relação à proteção da lipoperoxidação, sendo dependente: da espécie reativa, do conteúdo de ácidos graxos das membranas e sua heterogeneidade constitutiva. Sendo que os valores de  $IC_{50}$  são influenciados pelo número de insaturações dos fosfolipídios, a velocidade de difusão do radical e do antioxidante e a interação entre as cargas do substrato, do antioxidante e da espécie reativa. Deste modo, os complexos possuem uma moderada atividade antioxidante relativa a proteção de membranas, especialmente quando induzida por:  $\bullet OH$  e radiação UV utilizando microssomas e  $Asc^{\bullet}$  em ambos os modelos de membrana testados. Os valores de  $IC_{50}$  variam de 50-93  $\mu M$  nesses ensaios.

Os complexos nitrosilados de rutênio apresentaram fraca atividade antitumoral, sendo relatada uma potencial atividade antitumoral para àqueles complexos de rutênio tendo o ligante DMSO (ALESSIO et al. 1989; SAVA et al., 2002; BACAC et al., 2004)

Assim, o planejamento acerca do desenho molecular capaz de aumentar a eficiência de tal complexo em relação aos ensaios é fundamental, uma vez que a variedade de resultados relativos aos complexos, às características das espécies reativas e do ambiente celular são bastante complexas.

**Tabela 11.** Resumo das principais atividades antioxidantes. T: Trolox; MC: microssomas; LUV: vesícula unilamelar grande.

LOP	I C 50 μ M	Substância/Complexo						Mod. membrana
EROs/ERNs		T	A	B	C	D	E	MC
•OH			50	-	-	-	88	
Asc <sup>•+</sup>		19	69	-	-	63	-	
ONOO <sup>-</sup>		32	-	-	-	333	-	
UV		+50	91	-	-	-		
Asc <sup>•+</sup>			75	178	84	58	183	LUV
UV			+400	+400	+400	+400	+400	
Conformação		<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	

Sequestrador de ERO/ERN		IC50 (μM)	Substância/Complexo				
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>			A	B	C	D	E
•OH			237				
Conformação			12,7	14,1	10,3	3,8	>75
			<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>

TAR/ROO <sup>•</sup>		Concentração de 100 μM				
Complexo		A	B	C	D	E
I <sub>0</sub> /I		869	9	38	34	7
Conformação		<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>

Sequestrador de •NO		Controles		Concentração de 700 μM				
Complexo		CB	CP	A	B	C	D	E
% oxidação de Mb		61	100	71	58	57	63	70,5
Conformação				<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>

## 7 PERSPECTIVAS

Considerando os ensaios em ambiente lipofílico, no qual se utilizam modelos de membrana para a lipoperoxidação, a hidrofilicidade de todas tetraaminas nitrosiladas testadas foi limitante para a proteção da membrana. Alterações em torno dos ligantes poderiam favorecer a anfifilicidade molecular. Desta forma, os complexos seriam capazes de difundir melhor sobre as interfaces da membrana aumentando sua potência. Contudo, a solubilidade dos complexos em solução aquosa é fator relevante para os métodos utilizados. Ressalta-se ainda, a importância da incorporação dos complexos hidrofílicos em nanopartículas como uma estratégia de aumentar a concentração intracelular do complexo, no intuito de potencializar a atividade antitumoral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, V.; YIN, Z. TEW, K. D.; RONAI, Z.. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, n. 18, p. 6104-6111, 1999.

ALESSIO, E.; XU, Y.; CAUCI, S. MESTRONI, G.; QUADRIFOGLIO, F.; VIGLINO, P.; MARZILLI, L. G.. Novel diastereomers with opposite chirality at ruthenium formed by N7, $\alpha$ -PO<sub>4</sub> chelation of 5'-dGMP to the antimetastatic agent *trans*-RuCl<sub>2</sub>(DMSO) NMR and CD evidence. **Journal of the American Chemical Society**, n. 111, p. 7068-7071, 1989.

ALMEIDA E SILVA, D. C.; DA SILVA, R. S.; LOPES, R. F. V.. **Estudo da liberação fotoinduzida de NO a partir de formulações contendo o complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(4-pic)]<sup>+</sup>**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30. 2004. Águas de Lindóia. Pôster. Águas de Lindóia: SBQ, 2004.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; GAJEWSKI, E.; DIZDAROGLU, M.. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 34, p. 20509-20512, 1989.

BACAC, M.; HOTZE, A. C. G.; VAN DER SCHILDEN, K.; HAASNOOT, J. G.; PACOR, S. ALESSIO, E.; SAVA, G.; REEDIJK, J. The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: an NMR evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 402-412, 2004.

BARCLAY, L. R. C.; ANTUNES, F.; EGAWA, Y.; MCALLISTER, K. L.; MUKAI, K.; NISHI, T. VINQVIST, M. R.. The efficiency of antioxidant delivered by liposomal transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1328, p. 1-12, 1997.

BARNARD, C. F. J.. Platinum Anti-Cancer Agents. **Platinum Metals Review**, v. 33, p.162-167, 1989.

BECKMAN, J. S.. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**, n. 9, p. 836-844, 1996.

BEIRITH, A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BONETTI, V. R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M. M. S.; FRANCO, C. V.; CALIXTO, J. B.. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **European Journal of Pharmacology**, n. 369, p. 289-297, 1999.

BERTOLINI, W. L. H. M. Complexos de rutênio com nitrosil como agentes doadores de óxido nítrico. **Aspectos químicos e físico-químicos de suas aplicações como agentes terapêuticos**. 2004. 148. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H.. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 295-305, 1984.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215-222, 2007).

BORGES, S. S.; DAVANZO, C. V.; CASTELANO, E. E.; K-SCHEPECTOR, J.; SILVA, S. L.; FRANCO, D. W.. Ruthenium nitrosyl complexes with N-heterocyclic ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2670-2677, 1998.

MORRISON; R. T.; BOYD, R. N.. **Química orgânica**. 14 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

BRAUGHLER, J. M.; DUNCAN, L. A.; CHASE, R. L.. The involvement of iron in lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 5, p. 10282-10289, 1986.

BRUNINI, T. M. C.; PERIM, N.; COSTA, E.; MENDES-RIBEIRO, A. C.. The role of L-arginine-nitric oxide pathway in pulmonary diseases. **Pulmão RJ**, v.15, n.3, p. 184-190, 2006.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D.. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUTLER, A.; GLIDEWELL, C.. Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. **Chemical Society Reviews**., n. 16, p. 361-380, 1987.

CALLAHAN, R. W.; MEYER, T. J.. Reversible eletron transfer in Ruthenium nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 574-581, 1977.

CAMACHO-PEREIRA, J.; MEYER, L. E.; MACHADO, L. B.; OLIVEIRA, M. F.; GALINA, A.. Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria is modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1099-1110, 2009.

CARBALLO, M.; VILAPLANA, R.; MÁRQUEZ, G.; CONDE, M.; BEDOYA, F. J.; GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F.; SOBRINO, F.. A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils **Biochemical Journal**, n. 328, p. 559-564, 1997.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C.. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**., v. 28, p.137-149, 1996.

CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A.. Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed



unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, n. 37, p.135-141, 1997.

CLARKE, M. J.. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, n. 232, p. 69-93, 2002.

CLARKE, M. J.; ZHU, F.; FRASCA, D. R.. Non-Platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, n. 99, p. 2511-2533, 1999.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A.. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979

COHEN, G.. The generation of hydroxyl radicals in biologic system: toxicological aspects. **Photochemistry and photobiology**, v. 28, p. 669-675, 1978.

CRECZYNSKI-PASA, T. B; BONETTI, V. R.; BEIRITH, A.; CKLESS, K.; KONZEN, M., SEIFRIZ, I.; PAULA, M. S.; FRANCO, C. V.; WILHELM, FILHO, D.; CALIXTO, J. B. Complexes *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(nic)<sub>4</sub>] and *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(l-nic)<sub>4</sub>] as free radical scavengers. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 86, p. 587-594, 2001.

DA SILVA, R. S.; MARCHESI, M. S. P.; KHIN, C.; LUNARDI, C. N.; BENDHACK, L. M.; FORD, P. C.. Photoinduced electron transfer between the cationic complexes Ru(NH)pz and *trans*-RuCl([<sup>15</sup>]aneN)NO mediated by phosphate ion: visible light generation of nitric oxide for biological targets. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 111, n. 24, p. 6962-6968.

DE BONT, R.; LAREBEKE, K. V.. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v.19, n. 3, p. 169-185, 2004.

DE LIMA, V. R.. **Comportamento físico-químico de membranas bilipídicas: relação entre composição lipídica, agentes oxidantes e antioxidantes**. 2005. 175 p. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005

DE LIMA, V. R.; MORFIM, M. P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants. **Chemistry and Physics of Lipids**, n. 132, p. 197–208, 2004.

DEIANA, M.; ARUOMA, O. I.; BIANCHI, M. L. P.; SPENCER, J. P. E.; KAUR, H.; HALLIWELL, AESCHEBACH, R.; BANNI, S.; DESSI, M. A.; CORONGIU, F. P.. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. **Free Radical Biochemistry & Medicine**, v. 26, n.5/6, p. 762-769, 1999.

DELATTRE, J.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F.; PHILIPPOT, J. R.; SCHUBER, F.. **Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques**. Editions Médicales Internationales, Les Editions Inserm: Paris, 1993.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G.. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 31, p. 1163-1170, 1998.

EISERICH, J. P.; CROSS, C. E.; DANIEL JONES, A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A.. Formation of Nitrating and Chlorinating Species by Reaction of Nitrite with Hypochlorous Acid: a novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19199–19208, 1996.

ESTERBAUER H.; CHEESEMAN K. H.. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, p. 337-340, 1999.

FOLKERTS, G.; KLOEK, J.; MUIJSERS, R. B. R.; NIJKAMP, F. P.. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 251-262, 2001.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrofage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, p. 84-88, 2002.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C.. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia a base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRICKER, S. P.; SLADE, E.; POWELL, N. A.; VAUGHAN, O. J.; HENDERSON, G. R.; MURRER, B. A.; MEGSON, I. L.; BISLAND, S. K.; FLITNEY, F. W.. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases. **British Journal of Pharmacology**, n. 122, p. 1441–1449, 1997.

GALEANO, A.; BERGER, M. R.; KEPPLER, B. K.. Antitumoral activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines *in vitro*. **Arzneim-Forsch**, v. 42, p. 821-824, 1992.

GALLEANO, M.; AIMO, L.; PUNTARULO, S.. Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. **Toxicology Letters**, v. 133, p. 193–201, 2002.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. M.. The preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 471-474, 1971a.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. M.. Nitrosyl-nitrite, interconversion in ruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 2150-2153, 1971b.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMANN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v.4490, p.56-58, 1981.

GROSS, S. S. Microtiter plate assay for determining kinetics of nitric oxide synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 268, p. 159-168, 1996.

GUICHARD, S.M.; ELSE, R.; REID, E.; ZEITLIN, B.; AIRD, R.; MUIR, M.; DODDS, M.; FIEBIG, H.; SADLER, P. J.; JODRELL, D. I.. Anti-tumour activity in non-small cell lung cancer models and toxicity profiles for novel ruthenium(II) based organo-metallic compounds. **Biochemical Pharmacology**, n. 71, p. 408-415, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. C.. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interaction**, n. 91, p. 133-140, 1994.

HADDAD, J. J.. Antioxidant and prooxidant mechanism in the regulation of redox (Y)-sensitive transcriptional factors. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 11, p. 879-897, 2002.

HALLIWELL, B.. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Eds.). **Free Radical in Biology and Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: simple "test tube" assay for determination of rate constant for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, n. 1, p. 215-219, 1987.

HALPENNY, G. M.; OLMSTEAD, M. M.; MASCHARAK, P. K.. Incorporation of a designed ruthenium nitrosyl in polyHEMA hydrogel and light-activated delivery of NO to myoglobin. **Inorganic Chemistry**, n. 46, p. 6601-6606, 2007.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J.. Role of oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 345-350, 2001.

HARTMANN, M.; KEPPLER, B. K.. Inorganic anticancer agents: their chemistry and antitumor properties. **Comments on Inorganic Chemistry**, v. 16. p. 339, 1995.

HERCE-PAGLIAI, C.; KOTTECHA, S.; SHUKER, D. E. G.. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to Reactive Nitrogen Species: A Review. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 324-336, 1998.

HERENCIA, F., LOPÉZ-GARCIA, M. P., UBEDA, A., FERRÁNDIZ, M. L.. Nitric Oxide-scavenging properties of some chalcone derivatives. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 242-246, 2002.

HEROLD, S.. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 5, p. 565-579, 2004.

HOLANDA, A. K. M.; ARAÚJO, S. X. B.; LOPES, L. G. F.; MOREIRA, I. S.. **Síntese, caracterização e estudo da liberação de NO pelo íon complexo *cis*-[Ru(NO)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl<sub>3</sub>**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30. 2004. Águas de Lindóia. Pôster. Águas de Lindóia: SBQ, 2004.

HOLANDA, A. K. M.; DA SILVA, F. O. N.; SOUZA, J. R.; DIÓGENES, I. C. N.; CARVALHO, I. M. M.; MOREIRA, I. S.; CLARKE, M. J.; LOPES, L. G. F.. Photochemical NO release from nitrosyl Ru<sup>II</sup> complexes with C-bound imidazole. **Inorganic Chimica Acta**, n. 361, p. 2929-2933, 2008.

HOLANDA, A. K. M.; PONTES, D. L.; DIÓGENES, I. C. N.; MOREIRA, I. S.; LOPES, L. G. F.. NO release from trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L(NO)]<sup>3+</sup> complexes upon reduction (L = 1-methyl-imidazole or benzoimidazole). **Transition Metal Chemistry**, n. 29, p. 430-436, 2004.

HUBEL, C. A.; KAGAN, V. E.; KISIN, E. R.; MCLAUGHILIN, M. K.; ROBERTS, J. M.. Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23 n. 4, p. 597-609, 1997.

IGNARRO, L. J. Endothelium-Derived Nitric Oxide: Pharmacology and Relationship to the actions of organic nitrate esters. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 8. p. 651-659, 1989.

ISCHIROPOULOS, H.. Introduction to serial reviews: reactive nitrogen species, tyrosine nitration and cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 6, p. 727, 2002.

\_\_\_\_\_. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 776-783, 2003.

KAMATA, H. HIRATA, H.. Redox regulation of cellular signalling. **Cellular Signalling**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1999.

KEHRER, J. P.. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 1, n. 23, p.21-48, 1993.

KLOTZ, L. O.; SCHROEDER, P.; SIES, H.. Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 6, p. 737-743, 2002.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**, n. 298, p. 249-258, 1994.

KOPPENOL, W. H.. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 4/5, p. 385–391, 1998a.

KOPPENOL, W. H.. The chemistry of peroxynitrite, a biological toxin. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 326-331, 1998b.

KOPPENOL, W. H.; KISSNER, R.; BECKMAN, J. S.. Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? **Methods in Enzymology**, v. 269, p.296-302, 1996.

KOTZ, J. C.; TREICHEL JR., P.. **Química e reações químicas**. 3. ed., Rio de Janeiro: LTC, 1998. 2 v.

LEHNINGER, A. L.. **Princípios da bioquímica**. Tradutor: Lodi, W. R.; Simões, A. A.. 3. ed.. São Paulo: Sarvier 1986.

LEPERRE, A.; MILLART, H.; PREVOST, A.; TRENQUE, T.; KANTELIP, J. P.; KEPPLER, B. K.. Compared effects of ruthenium red and cis[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] on isolated ischaemic-reperfused rat heart. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, n. 9, p. 545-553, 1995.

LEDBETTER, J. W., SCHAERTEL, S.. Pyridinyl and ketyl radicals of pyridoxal-5-phosphate on micellar and liposomal surfaces. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 47, p. 12–21, 1998.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y.. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 33, p. 337-462, 1988.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3. p. 293-303, 2001.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I.. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1465-1469, 2007.

LISSI, E. A.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D.. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 1995.

LIU, J.; ZHENG, W.; SHI, S.; TAN, C.; CHEN, J.; ZHENG, K.; JI, L.. Synthesis, antitumor activity and structure–activity relationships of a series of Ru(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Accepted Manuscript, 2007.

LOPES, L. G. F.; WIERASZKO, A.; EL-SHERIF, C. Y.; CLARKE, M. J.. The *trans*-labilization of nitric oxide in Ru<sup>II</sup> complexes by C-bound imidazoles. **Inorganica Chimica Acta**, n. 312, p. 15–22, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., RANDALL, R. J.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUNARDI, C. N.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.. new nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 87-93, 2009.

LUNARDI, C. N.; CACCIARI, A. L.; DA SILVA, R. S. BENDHACK, L. M.. Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 252–258, 2006.

LUNARDI, C. N; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor  $\text{cis-[Ru(Cl)(bpy)}_2\text{(NO)](PF}_6\text{)}$  is due to activation of KCa by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p. 139–144, 2007.

MADHANI, M.; PATRA, K. A.; MILLER, T. W.; EROY-REVELES, A. A.; HOBBS, A. J.; FUKUTO, J. M.; MASCHARAK, P. K.. Biological activity of designed photolabile metal nitrosyls: light-dependent activation of soluble guanylate cyclase and vasorelaxant properties in rat aorta. **Journal of Medical Chemistry**, n. 49, v. 25, p. 7325-7330, 2006.

MARCONDES, F. G.; FERRO A. A.; SOUZA-TORSONI, A.; SUMITANI, M.; CLARKE, M. J.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; KRIEGER, M. H.. *In vivo* effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. **Life Science**, v. 70, n. 23, p. 2735-2752, 2002.

MCKAY, J. A.; MURRAY, G. I.; WEAVER, R. J.; EWEN, S. W. B.; MELVIN, W. T.; BURKE, M. D.. Xenobiotic metabolising enzyme expression in colonic neoplasia. **GUT**, n. 34, p. 1234-1239, 1993.

MONCADA, S.. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**. n. 92, p.164-169, 1999.

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

NAPOLI, C.; DE NIGRIS, F. WILLIAMS-IGNARRO, S.; PIGNALOSA, O.; SICA, V. IGNARRO, L. J.. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. **Nitric Oxide**, n. 15, p. 265–279, 2006.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n.2, p.351-358, 1979.

ORVIG, C. ABRAMS, M. J.. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2203, 1999.

OTERO, L.; SMIRCICH, P.; VIEITES, M.; CIGANDA, M.; SEVERINO, P. C.; TERENCE, H.; CERECETTO, H.; GAMBINO, D.; GARAT, B.. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium(II) nitrofurylsemicarbazone complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 74-79, 2007.

PAULA, M. M. S.; PICH, C. T.; PETRONILHO, F.; DREI, L. B.; RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J; A; P.; FRANCO, C. V.; DAL-PIZZOL, F.. Antioxidant activity of new ruthenium compounds. **Redox Report.**, v. 10, p. 139–143, 2005.

PUNTARULO, S.; CEDERBAUM, A. I.. Effect of oxygen concentration on microsomal oxidation of ethanol and generation of oxygen radicals. **Biochemical Journal**, v. 251, p. 787-794, 1988.

RADI, R. Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. **Actas de Fisiologia**, v. 6, p. 123-130, 2000.

\_\_\_\_\_. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **PNAS**, v. 101, n. 12, 4003-4008, 2004.

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; NAVILIAT, M.; CAYOTA, A.. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 463-488, 2001.

RADI, R.; RODRIGUEZ, M.; CASTRO, L.; TELLERI, R.. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 89-95, 1994.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R.. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J.. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**. v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A.. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, n. 92, p. 235-254, 2005.

RUSSEL, J. B.. **Química geral**. Tradução: Marcia Guekezian et al. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1994.

SAMUNI, A. M.; LIPMAN, A.; BARENHOLZ, Y.. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, p. 121-134, 2000.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M. C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v. 24, n. 7, p. 589-599, 1994.

SAUAIA, M. G.; OLIVEIRA, F. S.; DE LIMA, R. G. CACCIARI, A. L.; TFOUNI, E.; DA SILVA, R. S.. Syntheses, characterization and photochemical properties of new NO-ruthenium(II) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 8, p. 347-349, 2005.

SAVA, G.; BERGAMO, A.; ZORZET, S.; GAVA, B.; CASARSA, C.; COCCHIETTO, M.; FURLANI, A.; SCARCIA, V.; SERLI, B.; IENGO, E.; ALESSIO, E. MESTRONI, G. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 427-435, 2002.

SAVA, G.; K. CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCCHIETTO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E. MESTRONI, G.; PARBERINI, A.. Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. **Anticancer Drugs**, v. 10, n. 1, p. 129-138, 1999.

SCHENKMAN, J. B.; CINTI, D. L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 83-89, 1978.

SEIFRIZ, I.; KONZEN, M.; PAULA, M. M.S.; GONÇALVES, N. S.; SPOGANICKZ, B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BONETTI, V. R.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; FRANCO, C. V.. Synthesis, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological properties of *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dinic)<sub>4</sub>](dinic=3,5-pyridinecarboxylic acid). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 76, p. 153-163, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, n. 215, p. 213-219, 1993.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, n. 82, p. 291-295, 1997.

SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. J.. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of a thermophilic bacterium. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 81, p. 519-28, 1977.

SOUZA; J. M.; PELUFFO, G.; RADI, R. Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, n. 4, p. 357-366, 2008.

STANBRO, W. D. Modeling the linteraction of peroxynitrite with Low-density Lipoproteins. I: plasma levels of peroxynitrite. **Journal Theoretical Biology**, v. 205, p. 457-464, 2000a.

\_\_\_\_\_. Modeling the interaction of peroxynitrite with Low-density Lipoproteins.II: reaction/difusion model of peroxynitrite in Low-density Lipoprotein particles. **Journal Theoretical Biology**, v. 205, p. 465-471, 2000b.

\_\_\_\_\_. Modeling the interaction of peroxynitrite with Low-density Lipoproteins. III: The role of antioxidants. **Journal Theoretical Biology**, v. 205, p. 473-482, 2000c.

STORR, T.; CAMERON, B. R. GOSSAGE, R. A. YEE, H. SKERLJ, R. T.; DARKES, M. C.;FRICKER, S. P.; BRIDGER, G. J.; DAVIES, N. A.; WILSON, M. T.; MARESCA, K. P.; ZUBIETA, J.. Ru<sup>III</sup> complexes of Edta and Dtpa polyaminocarboxylate



analogues and their use as nitric oxide scavengers. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 13, p. 2685-2697, 2005.

SZABÓ C.; SOUTHAN G. J.; THIEMERMANN C.; VANE J. R. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, n. 113, p. 757-766, 1994.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W.. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 57-69, 2003.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. H.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A.. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 45, p. 18-31, 2008.

TORRES-FERNÁNDEZ, O.; ORDÓÑEZ, N.. Comparative effect of osmium tetroxide and ruthenium tetroxide on *Penicillium* sp. hyphae and *Saccharomyces cerevisiae* fungal cell wall ultrastructure. **Biomédica**, Bogotá, v. 23, p. 225-231, 2003.

TOTAH, A.; PIFANO, I.; CORTEZ, R.; RAMÍREZ, G.. Tratamiento de los melanomas malignos uveales posteriores con placas espiesclerales radioactivas cargadas con rutenio: experiencia en Venezuela/Radiotherapeutic treatment in posterior uveol malignant melanoma using ruthenium applicators: Venezuelan experience. **Revista Oftalmológica Venezolana**, v. 59, n. 3, p. 56-60, 2003.

TRYNDA-LEMIESZ, L.. Interaction of an anticancer ruthenium complex  $\text{HInd}[\text{RuInd}_2\text{Cl}_4]$  with cytochrome c. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 1, p. 199-205, 2004.

TSERNG, K. Y.; GRIFFIN, R.. Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 323, p. 84-93, 2003.

VALVASSORI, S.S.; CRISTIANO, M. P.; CARDOSO, D. C.; SANTOS, G. D.; MARTINS, J. QUEVEDO, M. R.; PAULA, M. M. S.. Pharmacological activity of Ruthenium complexes *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{L})_4]$  (L = nicotinic or i-nicotinic acid) on anxiety and memory in rats. **Neurochemical Research**, v. 3, p. 1457-1462, 2006.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F. DA; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO-JÚNIOR, A. A.. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídico e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, 1998

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T.. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VICTOR, E.G.; ZANETTE, F.; AGUIAR, M. R.; AGUIAR, C. S.; CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; STRECK, E. L.; PAULA, M. M. S.. Effect of ruthenium complexes on the activities of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, p. 59-66, 2007.

VILAPLANA, R.; ROMERO, M. A.; QUIRÓS, M.; SALAS, J. M.; GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F.. Synthesis, structure and antitumour properties of a new 1,2-propylenediaminetetraacetate-ruthenium(III) compound. **Metal-Based Drugs**, v. 2, n. 4, p. 211-219, 1995.

VAN DER VLIET, A.; EISERICH, J. P.; O'NEILL, C. A.; BARRIWELL, B.; CROSS, C. E. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 319, n. 2, p. 341-349, 1995.

VAN DER VLIET, A.; EISERICH, J. P.; SHIGENAGA, M. K. CROSS, C. E.. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration n respiratory tract. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, p. 1-9, 1999.

VLIETINCK, A. J.. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica**, v. 67, p. 515-519, 2001.

WAYNER, D. D. M.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. LOCKE, S.. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS Letters**, v. 187, n. 1, p. 33-37, 1985.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B.. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 4/5, p. 434-456, 1998.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v. 313, p. 17-29, 1996.

WOODCOK, S. R.; FREEMAN, B. A.. A new hammer in the redox toolbox: high-purity peroxynitrite for cell signaling and toxicology studies. **Chemical Research in Toxicology**, 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org>> Acesso em: 21 novembro 2008.

YAMAGUCHI, F. L.; VASSÃO, D. G.; KATO, M. J.; DI MASCIO, P.. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247, 2005.

YIN, J. J.; SMITH, M. J.; EPPLEY, R. M.; PAGE, S. M.; SPHON, J. A.. Effects of Fumisin B1 on lipid peroxidation in membranes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1371, p.134-142, 1998.

ZANICHELLI, P. G.; ESTRELA, H. F. G.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; FRANCO, D. W.. The effects of ruthenium tetrammine compounds on vascular smooth muscle. **Nitric Oxide**, v. 16, p. 189-196, 2007.

## 9. ANEXOS

### A. Trabalho apresentado em eventos

1. Monteiro-Cousseau, F. E., Hangai, M. M., Holanda, A. K. M., Moreira, I. S., Silva, F. O. N., Fernandes, H., Silva, J. A., Siqueira, I. R., Santos-Silva, M.C., Lopes, L. G. F., Creczynski-Pasa, T. B.. Antioxidant and antitumoral properties of nitrosyl ruthenium complexes. In: **XXXVII Simpósio Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2007, p. T-, Águas de Lindóia – São Paulo, Brasil.